T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université
(mention Sciences)

par

Suzanne C O H N - B O U R G E O I S

1ère THESE: Sur la nature du répresseur de l'Opéron Lactose d'*Escherichia coli*

2ème THESE: Proposition donnée par la faculté.

Soutenues le 2 novembre 1966 devant la Commission d'Examen

M. J. Monod — Président

MM. J. M. Dubert, F. Jacob — Examinateurs

T H E S E S

présentées

A L A F A C U L T E D E S S C I E N C E S

D E L ' U N I V E R S I T E D E P A R I S

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université
(mention Sciences)

par

Suzanne C O H N - B O U R G E O I S

1ère THESE: Sur la nature du répresseur de l'Opéron Lactose d'Escherichia coli

2ème THESE: Proposition donnée par la faculté.

Soutenues le 2 novembre 1966 devant la Commission d'Examen

M. J. Monod — Président

MM. J. M. Dubert, F. Jacob — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vous avez raison, monsieur, de vous
défier des panégyriques; ils sont
presque tous composés par des sujets
qui flattent un maître.

Voltaire

Ce travail fut réalisé sous la direction du Professeur Jacques Monod.

Il s'est enrichi des suggestions et critiques de MM. Melvin Cohn, François Jacob, Leslie Orgel et Niels Kjeldgaard.

Il a tiré profit de l'aide de Susie Kinoshita, Sharon Sherman, Allen Hight, Ron Newby et du Dr. Hiromi Suzuki.

C'est à Gisela Machschefes que revient le mérite d'avoir déchiffré mon grimoire.

A tous, qui m'ont aidée aux titres les plus divers, je voudrais exprimer ici ma sincère gratitude, sans oublier M. Jean-Marie Dubert qui a accepté d'examiner cette thèse.

Commencé dans le Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut Pasteur, ce travail fut complété au Salk Institute for Biological Studies, à La Jolla, où nous avons bénéficié de l'aide de la National Science Foundation, subvention No. GB-5302 à Melvin Cohn.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544322_0025

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I - Introduction générale — Pages

- L'existence de systèmes de régulations cellulaires et leur importance. 1

- Les éléments déterminant le métabolisme du lactose chez Escherichia coli. 1

- Le gène régulateur et son produit. 2
  Les mutants i^- (constitutifs) 2
  Les mutants i^s (surréprimés) 3

- L'opérateur et le promoteur 3

- Schéma de fonctionnement de l'opéron "Lac" et généralisation du système. 4

- Le modèle de structure et de fonctionnement des répresseurs et ses conséquences. 5

- Intérêt et but du travail. 8

CHAPITRE II - Matériel et techniques générales

I - Techniques microbiologiques 11
  a) Souches bactériennes
  b) Cultures en milieu liquide
  c) Cultures en milieu gélosé
  d) Détection d'organismes diploïdes et croisements
  e) Traitement à l'acridine
  f) Détection de souches constitutives par coloration au "Fast Blue"

II - Techniques biochimiques 16
  a) Dosages enzymatiques
  b) Chromatographie

III - Produits chimiques 18

CHAPITRE III - Etude de mutants surréprimées (i^s)

I - Introduction 20

II - Isolement de mutants i^s 20
- Mutants isolés après irradiation UV 21
- Mutants isolés après traitement à la nitrosoguanidine 23

III - Expression de mutations i^s 25
- Effet pléiotrope de mutations i^s 26
- Spectre d'induction des mutants i^s 28
- Effet de la température sur la synthèse de β-galactosidase par les mutants i^s 30
- Dominance quantitative des mutations i^s 32
  a) analyse de diploïdes $i^+z^+y^+/Fi^sz^+y^+$ 33
  b) analyse de diploïdes $i^sz^+y^-Rec^-/Fi^+z^+y^+$ 33
  c) analyse de diploïdes $i^so^+z^+y^+/Fi^+o^cz^+y^+$ 36
  d) analyse de diploïdes $i^s_{43}z^+y^+/Fi^-z^+y^+$ 38
- Propriétés de la β-galactosidase induite chez certains mutants i^s 41
  a) activité in vivo 41
  b) action in vitro sur le lactose 42
- Etude de l'absence d'induction par le lactose de mutants i^s 44
  a) essai d'induction d'i^s_{14A} à faible concentration en lactose en présence de glycérol 46
  b) essai d'induction d'i^s_{14A} par le lactose à la faveur d'une diauxie en glucose + lactose 47
  c) effet du glucose sur l'induction par l'IPTG de i^s_{14A} 50
  d) expression de la mutation i^s_{43} dans une souche "répression catabolique" négative 52

- Caractéristiques de l'induction par l'IPTG du mutant i^s_{14A}. 53

IV - Restauration du phénotype Lac^+ par mutation des i^s 59

a) Types de mutations restaurant le phénotype Lac^+ 60

b) Analyse de diploïdes $i^s i^- z^+ / Fi^+ z^o$ 64

V - Conclusions et discussion 68

CHAPITRE IV - Etude de la suppression de mutations i^- et o^c

I - Introduction 70

II - Résultats

- Isolement de mutants suppressibles 71
- Dominance du caractère i^s recouvré après suppression d'$i^s i^-$ 73
- Suppression quantitative de 7 souches $i^s i^-$ par 4 suppresseurs 74
- Essais de suppression de mutations o^c 76

III - Conclusions et discussion 78

CHAPITRE V - Complémentation entre mutants du gène i

I - Introduction 83

II - Résultats

- Isolement et fréquence de mutants $i^s_{43} i^-$ complémentant le gène i^+ 84
- Etude quantitative de la complémentation 84
  a) complémentation entre $i^s_{43} i^-_{636}$ et i^+ 84
  b) complémentation entre $i^s_{43} i^-_{636}$ et $i^+ o^+ z^o$ à deux températures 86
  c) complémentation entre mutants i^- 86

III - Conclusions et discussion 89

CHAPITRE VI - Résumé, discussion générale et conclusions du travail

I - Résumé des principaux résultats et de leur interprétations 91

II - Discussion générale et conclusions 94

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 97

LISTE DES ABBREVIATIONS 100

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

L'existence de systèmes de régulations cellulaires et leur importance.

L'avantage sélectif que représente la soumission au milieu des mécanismes exprimant l'information génétique des cellules vivantes, suggère l'existence d'une régulation économique et souple des activités cellulaires. Ceci est confirmé par une série de données démontrant la capacité de diverses cellules vivantes, tant animales que végétales, de modifier leur fonctionnement en réponse à certains changements des conditions du milieu. Ce phénomène implique que seule se manifeste une fraction, d'ailleurs variable, du potentiel génétique porté par les cellules. Cette dernière propriété est d'autant plus fondamentale qu'elle propose en corollaire une interprétation de la différentiation cellulaire comme étant le résultat de différentes régulations imposées à des cellules de génome identique et stabilisées au cours du développement de l'oeuf fécondé.

C'est toutefois l'étude des bactéries qui a apporté la preuve définitive de l'existence de modes de régulation des activités cellulaires et en a suggéré un mécanisme au niveau moléculaire. Le fait que des bactéries en croissance exponentielle n'accumulent et n'excrètent que très peu de métabolites indique que l'ensemble de leur métabolisme est orienté en fonction des besoins et soumis à un réseau complexe de circuits de régulation. L'examen de voies métaboliques particulières a révélé l'existence de deux types de régulation. La synthèse des enzymes catalysant une chaîne de réactions anaboliques est réprimée par le produit de cette chaîne qui double d'ailleurs cette répression de synthèse d'enzymes d'une inhibition de l'activité de certains d'entre eux. Au contraire, de nombreux composés induisent la synthèse des enzymes intervenant dans leur dégradation. L'étude de la régulation du métabolisme du lactose chez E. coli a permis à Jacob et Monod (1, 2) de formuler un modèle généralisé de régulation de synthèse d'enzymes dans lequel la répression et l'induction représentent deux effets du même mécanisme fondamental.

Les éléments déterminant le métabolisme du lactose chez Escherichia coli.

Trois réactions enzymatiques sont mises en jeu dans le métabolisme des

β-galactosides; elles sont catalysées par:

- la β-galactoside perméase (Y) concentrant à l'intérieur des bactéries les β-galactosides du milieu;

- la β-galactosidase (Z) catalysant la transgalactosidation du galactose des β-galactosides et, notamment, leur hydrolyse;

- la β-thiogalactoside transacétylase (A), dont le rôle physiologique est inconnu, catalysant la réaction:

$$\text{IPTG} + \text{Acétyl Co A} \rightleftharpoons \text{6 acétyl IPTG} + \text{Co A}$$

Les gènes (z, y, a) déterminant la structure de ces trois enzymes sont étroitement liés dans la région "Lac" du chromosome et placés dans l'ordre z-y-a. Ce groupe de gènes constitue un "opéron" dont l'expression est soumise au même système de régulation, certains composés, généralement des β-galactosides ou des dérivés, induisant la synthèse quantitativement coordonnée de Z, Y, et A.

La découverte et l'étude de mutations pléiotropes affectant simultanément la régulation de synthèse des trois enzymes de l'opéron "Lac" sans affecter leur structure a permis de mettre en évidence certains déterminants génétiques de cette régulation: un gène "régulateur" (i), un gène opérateur (o) et un élément "p" vraisemblablement promoteur de la transcription. Trois types de mutants manifestant une régulation de "l'opéron lactose" ("Lac") différente de celle des bactéries de type sauvage ont été observés. La description et l'interprétation de ces mutations, essentielles à la compréhension de notre travail, sont résumées ci-dessous.

Le gène régulateur et son produit.

Les mutants i^- (constitutifs).

Ces mutants produisent un taux élevé des enzymes Z, Y, et A en absence d'inducteur. Si ce taux de synthèse "constitutive" n'atteint pas toujours le taux obtenu par induction maximum, il peut toutefois être amené au taux maxi-

mum par addition d'inducteur. E. coli peut être rendu diploïde pour une partie du chromosome couvrant la région Lac grâce à l'introduction d'une épisome, portant le déterminant du caractère sexuel, F, et la région Lac (épisome Flac), état diploïde que nous représenterons par la notation $i^+z^+y^+a^+/Fi^-z^+y^+a^+$ par exemple, dans le cas où l'épisome portera l'allèle muté i^- du gène i. Le gène i a été localisé génétiquement, lui aussi, dans la région Lac non loin du gène z sans y être toutefois lié étroitement. Un tel diploïde est phénotypiquement inductible, le gène de type sauvage i^+ étant dominant sur l'allèle i^-. Ceci indique que le gène i^+ exerce un contrôle négatif sur l'opéron "Lac" en déterminant la synthèse d'un produit nommé "répresseur" (R), qui réprime la synthèse des enzymes "Lac" et dont l'action est neutralisée par les inducteurs. Un gène muté i^- soit ne produirait aucun répresseur soit produirait une forme inactive (R^-) de celui-ci.

Les mutants i^s (surréprimés).

Ces mutants synthétisent les enzymes "Lac" à un taux comparable à celui des bactéries de type sauvage i^+ non induites, mais inchangé par addition d'inducteur. Cette mutation, tout comme les mutations i^-, est localisée dans le gène i responsable de la synthèse du composé répresseur "R". La dominance du caractère i^s dans un diploïde de type $i^+z^+y^+a^+/i^sz^+y^+a^+$ contraste avec le comportement récessif par rapport à l'allèle sauvage de mutations i^- ou des mutations dans l'un des gènes de structure (z, y, ou a); elle indique la présence chez ces mutants d'un répresseur muté (R^s) dont l'action inhibitrice, intacte cette fois et insensible à l'addition d'inducteur, l'emporte dans un diploïde sur celle d'un répresseur de type sauvage (R^+) dont l'effet peut être réversé par un inducteur. Cette dominance a amené Jacob et Monod à attribuer à la fois à ce répresseur, produit du gène i^+, les trois propriétés d'inhiber la synthèse des enzymes "Lac", de reconnaître spécifiquement leurs inducteurs et de répondre à ces inducteurs en levant cette inhibition, ensemble de caractéristiques qui ne peuvent être que l'apanage d'une macromolécule. Cette interprétation sera discutée au cours du présent travail.

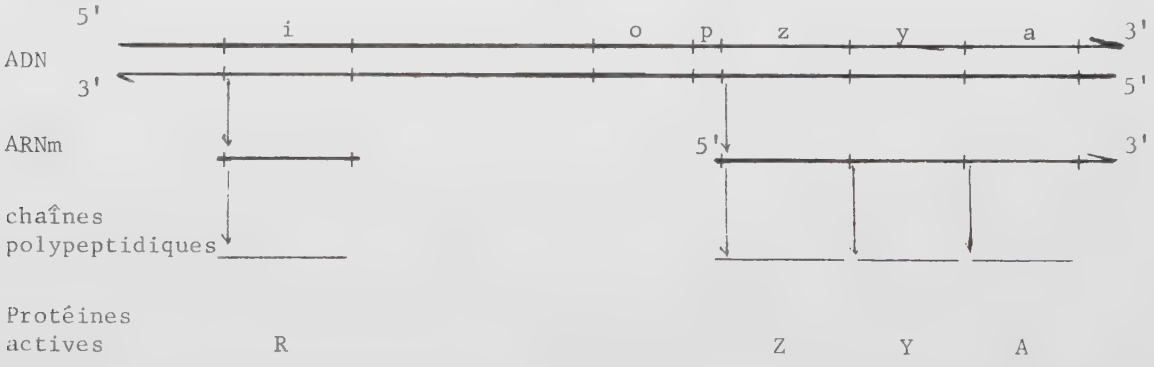
L'opérateur et le promoteur.

Certains mutants, désignés sous le nom de o^c ("opérateur constitutif"), synthétisent constitutivement un taux des enzymes "Lac" qui, plus élevé que le taux synthétisé par les bactéries de type sauvage o^+ non induites, varie d'un

mutant o^c à l'autre et peut être ou non sensible à l'addition d'inducteur. Dans un diploïde de type $i^{+}o^{+}z^{-}y^{+}a^{+}/Fi^{+}o^{c}z^{+}y^{-}a^{+}$ l'allèle o^c manifestera son effet uniquement sur les gènes de structure inscrits dans la même molécule d'ADN (en cis) sans agir (en trans) sur l'expression des gènes "Lac" du chromosome. Ce comportement, unique aux mutants o^c, a permis de localiser le site d'action du répresseur. Le lieu des mutations o^c est la région adjacente à l'extrémité du gène z distale du gène y, région "opérateur" dotée, dès lors, du pouvoir de reconnaître le répresseur spécifique de l'opéron qu'elle controle et de permettre son action. Le fait qu'une délétion de l'opérateur semble nécessaire à l'apparition du comportement o^c (3), ainsi que l'incapacité de l'allèle o^+ d'agir en trans sur un opérateur o^c, suggèrent que l'opérateur ne fonctionne pas à la manière des gènes de structure, qui sont "transcrits" en ARN messager, traduit ensuite en protéines. On sait, d'autre part, que l'opéron "Lac" est transcrit dans l'ordre z, y, a en un ARN messager polycistronique et que la délétion de l'extrémité (p) du gène z voisine de l'opérateur abolit l'expression de cet opéron (3). Ceci a fait attribuer à la région "p" un rôle "promoteur"de la transcription de l'ADN, rôle remplit vraisemblablement en fournissant à la ARN-polymérase un site d'attachement à partir duquel elle peut commencer à synthétiser le message.

Schéma de fonctionnement de l'opéron "Lac" et généralisation du système.

L'ordre des éléments de l'opéron "Lac" définis jusqu'à présent et leurs fonctions respectives peuvent être schématisés comme suit:



Il a été démontré (4) que l'ARN polymérase transcrit une seule des chaines de l'ADN et synthétise l'ARN à partir de son extrémité présentant l'atome de carbone 5' triphosphate (extrémité 5'), correspondant à la chaîne de l'ADN se terminant par un atome de carbone 3' hydroxylé (extrémité 3') (5, 6). C'est

à partir de son extrémité 5' que l'ARN est traduit (7, 8). La localisation du promoteur à l'extrémité 5' du DNA opérateur suggère que l'opérateur n'est pas transcrit, donc pas traduit, sans éliminer évidemment la possibilité que l'opérateur soit régit par un autre promoteur situé à son extrémité 3'.

C'est l'ensemble de ces données qui a conduit Jacob et Monod à formuler l'hypothèse selon laquelle le répresseur agirait directement au niveau de l'ADN "opérateur", empêchant à l'ARN polymérase l'accès au promoteur et inhibant de ce fait la transcription de l'opéron. Cette hypothèse est renforcée par une série d'expériences (9) démontrant l'augmentation par induction de l'opéron "Lac" de la quantité d'ARN hybridisable spécifiquement avec l'ADN de la région Lac. Il nous reste à présenter le modèle de fonctionnement des répresseurs proposé par Monod et al. (10), qui rend compte de l'ensemble des propriétés qu'il faut leur attribuer.

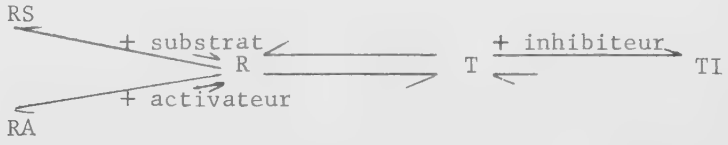
Le modèle de structure et de fonctionnement des répresseurs et ses conséquences

Un grand nombre de données hétérogènes et souvent paradoxales accumulées ont conduit Monod et al. (10) à formuler le concept "d'interactions allostériques" et à en proposer un modèle (11). Ce modèle rend compte de nombreux effets inhibiteurs ou activateurs sur divers enzymes de composés sans analogie stérique ou réactivité avec le substrat et, en général, des effets exercés sur l'activité d'une protéine (enzymatique ou non) par des composés sans analogie avec celui sur lequel la protéine agit. L'importance d'effets "allostériques" dans la régulation de l'activité de nombreux enzymes ainsi que dans l'action des stéroïdes et de l'hémoglobine n'est plus douteuse, quel que soit le mécanisme intime que l'on en propose. L'attribution de propriétés allostériques aux répresseurs de synthèse de protéines rend compte également des caractéristiques de leur induction et de leur répression et entraîne une série de prédictions vérifiables expérimentalement. Rappelons les principales caractéristiques des protéines allostériques.

Seules les protéines possédant au moins deux sites non superposés récepteurs de ligands (substrat au effecteur allostérique) sont le siège de phénomènes réunis sous le nom "d'effets allostériques". Ces phénomènes se manifestent comme une interaction réciproque entre ces sites telle que la liaison de l'un d'entre eux avec un effecteur provoque un changement d'affinité de l'autre site pour son ligand. Ces interactions entre sites ne sont pas le ré-

sultat de l'interférence stérique avec l'un des sites d'un effecteur lié à l'autre site. Ces interactions semblent plutôt transmises d'un site à l'autre par la molécule elle-même à la faveur d'un changement de sa structure résultant de la liaison de l'effecteur. Le modèle qui fut proposé pour rendre compte de ces interactions pose que toute protéine allostérique est en équilibre, en absence de ligands, entre plusieurs états, au moins deux (R et T), ayant des affinités différentes pour chacun des effecteurs. L'addition d'effecteurs, déplaçant cet équilibre, favorisera la transition d'un état à l'autre et changera la proportion de chacune des formes R et T. Appliquons ce modèle à un exemple d'effet allostérique observé expérimentalement (12) telle l'activation de la L-thréonine-déaminase par la valine et son inhibition par l'isoleucine.

Une série de données permettent d'attribuer à cette enzyme trois sites non superposés (S, A, et I). Si ses deux états allostériques R et T sont tels que la forme R présente une affinité élevée pour le substrat S et pour un activateur A, tandis que la forme T n'aurait qu'une affinité négligeable pour S et A, mais une affinité élevée pour un inhibiteur I, le modèle allostérique propose l'équilibre ci-dessous qui rend compte des phénomènes observés:



Cet exemple illustre un cas d'interactions dites "hétérotropes", c'est-à-dire entre sites occupés par des ligands différents, qui sont soit positives (coopérativité entre S et A), soit négatives (antagonisme entre S et I). Remarquons que la plupart des effets allostériques mis en évidences chez des enzymes ont été mesurés par leurs conséquences indirectes sur l'activité enzymatique. Certains phénomènes allostériques ont toutefois été mis en évidence également par mesure de l'affinité de liaison des effecteurs, seule démonstration vraiment directe de ces interactions. Le premier effet de ce type observé sur la liaison d'un effecteur est la forme sigmoïde de la courbe de saturation de l'hémoglobine par l'oxygène en fonction de la concentration de ce ligand. On sait que l'hémoglobine est un tétramère et un changement de structure lors de son oxygénation a été directement démontré. L'effet de coopérativité entre les sites identiques récepteurs d'oxygène (ou interaction "homo-

trope") est absent chez la myoglobine, monomère "naturel" de l'hémoglobine. Un grand nombre d'enzymes à propriétés allostériques se sont révélés être composés de sous-unités, et l'influence d'effecteurs allostériques sur leur association a été démontrée dans divers cas, et tout d'abord chez la phosphorylase b (13). Enfin, l'action de divers agents altérant la conformation de protéines, tels l'urée, la chaleur ou les composés mercuriels, de même que les changements de pH et des mutations dans le gène de structure de certains enzymes, altérent ou abolissent les effets allostériques tant hétérotropes que homotropes. Il semble donc légitime de conclure que d'une part les protéines allostériques sont composées de sous-unités et, d'autre part, les transitions allostériques correspondent à un changement d'interaction entre ces sous-unités notamment à un relâchement de leur association conduisant dans des cas extrêmes à leur dissociation. Enfin, ces changements d'association de sous-unités protéiques modifie l'affinité de leurs sites pour les ligands.

Citons à présent les principales données expérimentales incitant à attribuer au répresseur de l'opéron "Lac" les propriétés d'une protéine allostérique.

La spécificité de R vis-à-vis des inducteurs et l'existence d'un mutant manifestant un répresseur thermolabile (14) sont en accord avec l'hypothèse de sa nature protéique. En outre, le modèle du répresseur formé par association de sous-unités fournit une interprétation satisfaisante du comportement d'un mutant (15) où la synthèse de R est thermosensible. L'attribution à R de deux sites (O et I) liant l'un l'opérateur (O) et l'autre les inducteurs (I) rend compte à la fois de l'existence et des propriétés des mutants i^- et i^s: ces mutations affecteraient respectivement le premier ou le second de ces sites dont les affinités dépendent de leur interaction enclanchée par l'inducteur. L'effet de l'IPTG sur la thermostabilité du répresseur de mutants du gène i (15), ainsi que la forme sigmoïde de la courbe d'induction en fonction de la concentration d'inducteur (16), confirme l'existence d'une telle interaction. Enfin l'induction et la répression seraient le résultat soit de l'inactivation de R par les inducteurs soit de sa transformation en un R actif sous l'action des co-répresseurs.

L'équilibre entre deux états (R et T) du répresseur que nous propose le modèle allostérique peut donc s'écrire:

avec:

affinité de R vis-à-vis des inducteurs>affinité de T vis-à-vis des inducteurs

affinité de R vis-à-vis de l'opérateur<affinité de T vis-à-vis de l'opérateur

ou:

$$\frac{\text{aff. } R_I}{\text{aff. } T_I} > 1 < \frac{\text{aff. } R_o}{\text{aff. } T_o}$$

Cette différence d'affinités relatives a pour conséquence un interaction hétérotrope négative (I → O) accompagnée d'un effet homotrope coopératif (I · I).

Intérêt et but du travail.

La vérification du modèle présenté attend, évidemment, la mise au point de techniques de dosage d'activité du répresseur dont dépendent son isolement et sa purification. Sa vraisemblance réside dans sa stricte analogie avec les systèmes allostériques qui, accessibles à l'expérimentation, n'ont fait que le confirmer. La découverte chez les bactéries d'un grand nombre d'opérons, tant inductibles que répressibles, accompagnée souvent de l'isolement de mutants de type i^- et o^c en élargit l'intérêt. Ne faisant appel qu'à des notions valables pour toutes les cellules vivantes (DNA, RNA, transcription, allostérie, etc. ....), il pourrait s'appliquer aussi aux cellules d'organismes supérieurs chez lesquels ont été démontrés des phénomènes isolés d'induction et de répression d'enzymes, non groupés en opérons toutefois.

Sans être pour autant le seul mécanisme de régulation de synthèse de protéines à la disposition des cellules vivantes, il semble susceptible d'avoir une application générale. Dans son contexte, les répresseurs, contrôlant chacun un opéron, apparaissent comme des substances clé des activités cellulaires. Ce sont eux qui, percevant et réfléchissant les conditions du cytoplasme et du milieu, élisent en définitive la fraction du potentiel génétique que la cellule exprimera dans une situation donnée. Leur sensibilité à la concentration en inducteur ou corépresseur assure un contrôle mesuré, leur spécificité vis-à-vis des effecteurs et des opérateurs limite efficacement leur action tandis que leur diversité rend la cellule ajustable à des conditions variées.

L'ensemble de ces considérations font du modèle présenté une hypothèse de

travail attachante et que nous avons adoptée. Il nous paraît, en outre, plus simple que divers autres modèles qui rendent également compte de l'ensemble des faits observés et que nous citerons ici brièvement afin de faciliter la discussion de nos données. Comme le souligne Brenner dans une revue récente (17), les principales différences entre ces hypothèses résident dans les propriétés attribuées à l'opérateur.

Le modèle présenté ci-dessus suppose que le gène opérateur ne serait ni traduit ni même transcrit en ARN messager. Sur cette base on peut d'ailleurs concevoir déjà deux modèles pour le répresseur:

- R serait une protéine sans activité enzymatique bloquant l'opérateur en s'y liant directement ou par l'intermédiaire d'ARN-m du gène i;

- R serait une enzyme, une ADN déméthylase, par exemple, inactivant l'opéron en modifiant l'ADN opérateur.

Si l'on suppose que l'opérateur, sans être traduit, est toutefois transcrit, le répresseur, produit du gène i, pourrait agir au niveau de la traduction (18) de l'ARNm, soit en l'inhibant, soit en détruisant spécifiquement ce messager. Enfin, l'hypothèse que l'opérateur serait traduit en une protéine (O) suggère au moins trois différents modes d'action du répresseur:

1. Le gène i pourrait spécifier la structure d'une enzyme synthétisant un métabolite répresseur, tandis que la protéine opérateur serait le siège de l'interaction de l'opérateur, de l'inducteur et de ce co-répresseur.

2. Le produit du gène i pourrait être une protéine (R) qui, liée à l'opérateur par l'intermédiaire de la protéine O, formerait une structure OR siège d'action des inducteurs.

3. Le produit de i pourrait inactiver une espèce particulière d'ARN de transfert nécessaire à la traduction de l'opérateur et des autres gènes de l'opéron.

Nous avons essayé au cours de ce travail de réunir des données sur l'induction de l'opéron "Lac" susceptibles de faciliter un choix entre ces alter-

natives.

Nous nous sommes attachés, notamment, à vérifier certaines prédictions entraînées par le modèle de Jacob et Monod et, tout d'abord, à isoler et caractériser une série de nouveaux mutants i^s. Cette étude est d'autant plus intéressante que les mutants de type i^s sont, jusqu'à présent, uniques à l'opéron Lac. Le modèle à la base de leur interprétation prédit leur existence chez les autres systèmes inductibles. Toutefois, leur isolement et leur caractérisation dépendent en grande partie de la possibilité d'obtenir des bactéries diploïdes pour la région portant le gène i considéré, ce qui n'a pas encore été accompli pour les gènes régulateurs de tous les systèmes inductibles connus. Quant aux mutations i^s de systèmes répressibles, s'il est vrai qu'elles affectent le site d'attachement de l'effecteur, co-répresseur dans ce cas, elles se manifesteront simplement par une synthèse non répressible, c'est-à-dire constitutive, d'enzymes. Nous avons ensuite apporté une démonstration définitive de la nature protéique du produit de i par suppression d'i^- à l'aide de gènes suppresseurs de mutations amber et ochre. Nous avons également observé des phénomènes de complémentation entre allèles du gène i indiquant que R est composé de sous-unités, probablement identiques, sans préciser toutefois la nature mono- ou polycistronique de i. Enfin, nos résultats négatifs de suppression d'un grand nombre de mutants o^c confirme que le fonctionnement de ce gène est différent de celui des gènes de structure et apporte, sinon une preuve, au moins un argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'opérateur n'est pas traduit.

CHAPITRE II

MATERIEL ET TECHNIQUES GENERALES

I. Techniques microbiologiques

a) Souches bactériennes.

Toutes les souches utilisées sont dérivées de Escherichia coli K12. Le tableau I, page 12, indique l'origine et les propriétés des souches reçues à partir desquelles nous avons isolé au cours du présent travail une série de mutants, recombinants et diploïdes tel qu'il est décrit pour chaque expérience.

b) Cultures en milieu liquide.

Toutes les cultures en milieu liquide sont aérées par agitation et maintenues à 37° sauf indication contraire. Les milieux utilisés ont les compositions suivantes:

Milieu minéral 63: KH_2PO_4: 13,6 gr; $(NH_4)_2SO_4$:2 gr; $MgSO_4 . 7H_2O$: 0,2 gr; $FeSO_4 . 7H_2O$: 0,005 gr; H_2O 1 L pH 7,2 ajusté par KOH.

Milieu Tris: Tris 0,1 M; KCl 0,03 M; NH_4Cl 0,04M; $MgCl_2$ $2,5 10^{-3}$ M; Na_2HPO_4 10^{-3}M; Na_2SO_4 $7 10^{-4}$M; pH ajusté à 7,6 par HCl.

Ces deux milieux minéraux sont additionnés d'une source carbonnée, soit glycérol (2 gr/L) ou succinate (2 gr/L) ainsi que des facteurs nécessaires à la croissance notamment certains acides aminés (0,2 gr/L), de la thiamine (0,5 mgr/L) ou de l'adénine (5 mgr/L).

Bouillon nutritif: Nutrient broth 8 gr; NaCl 5 gr; Neopeptone 10 gr; eau 1 litre. pH ajusté à 7,4 par NaOH.

c) Cultures en milieu gélosé.

Milieu synthétique 63: même composition que précédemment additionné de 15 gr/L agar.

TABLEAU I

Origine et caractéristiques des souches bactériennes

nom	sexe	Génome chromo. izy	Lac épi. izy	facteurs de croissance	T_6	Sm	Autres caractéristiques pertinentes	Origine
2000m/FLac$^+$	F'	-++	+++	AHB_1		R		F. Jacob
200PS/FLac$^+$	F'	++-	+++	B_1		S		"
2000k	F$^-$	+++		$ATLB_1$		R		"
C_{600}	F$^-$	++-		TLB_1		R		"
2340	F$^-$	--+		B_1		R		"
2000 X_2	F$^-$	+--		AB_1		R		"
C_{6000}/FLac$^+$	F'	+++	+++	TLB_1		S		"
2000 U118 m	F$^-$	+-+		AHB_1		R		"
2300e	F$^-$	-++		$AAd.B_1$		R		"
3000X74	Hfr	délétion		B_1		S		"
$C_{600}o^c$/Fo^c	F'	o^c+-	o^c++	TLB_1		S		"
58F$^-$	F$^-$	+++		MB_1		R		"
2000 Y18 m	F$^-$	s++		AHB_1		R		"
200C YA694 m	F$^-$	s++		AHB_1		R		"
2000 X74m	F$^-$	délétion		AHB_1		R		"
230U	F$^-$	-+-		B_1		R		"
3000	Hfr	+++		B_1		S		"
RV/FG23	F'	(-++)	-++	B_1		S		"
2N01C	F$^-$	-+-		TLB_1		R		"
Z135	F$^+$	s++		Try		S		D. Zipser
LA-12	F$^-$	+++				R	repr.catab.négative	W. Loomis
FS26-19	F$^-$	+++		H Try	S	R	su$^-$	A. Garen
FS26R_1D-2	F$^-$	+++		H Try M	S	R	su$^+_1$ (amber)	"
FS26 R_1E-7	F$^-$	+++		H	S	R	su$^+_2$ (amber)	"
FH12 R_8 a-1	F$^-$	+++		M	S	R	su$^+_3$ (amber)	"
FH12 R_7 a-2	F$^-$	+++		M	S	R	su$^+_4$ (ochre)	"

Toutes les souches obtenues au cours du présent travail, non mentionnées dans ce tableau, sont dérivées des souches ci-dessus de la façon décrite pour chaque expérience.

Bouillon: Nutrient broth 8 gr; bacto tryptone 10 gr; yeast extract 0,1 gr; NaCl 5 gr; bacto-agar 15 gr; eau 1 litre; pH ajusté à 7,4.

Milieu indicateur contenant éosine et bleu de méthylène (EMB): Levine EMB agar Difco 37,5 gr/L.

Milieu indicateur au tétrazolium (TTZ): Bacto tryptone 8 gr; yeast extract 1 gr; NaCl 5 gr; bacto agar 15 gr; eau 1 litre - Ajuster le pH à 7,0. Ajouter après autoclavage: lactose (10 gr/L) et tétrazolium (50 mgr/L) stérilisé par filtration.

Milieu indicateur MacConkey (Mac): MacConkey Agar Base 40 gr; lactose 10 gr; eau 1 litre.

d) Détection d'organismes diploïdes et croisements.

Les croisements entre Hfr et F^- sont effectués en bouillon liquide, maintenus à 37^o et interrompus par agitation violente après le temps nécessaire au passage du gène pour lequel nous désirons obtenir des recombinants. Les transferts d'épisomes sont effectués dans le même milieu et le mélange de souches F' et F^- (dans les proportions 5:1 en général) maintenu 1 h à 37^o sans agitation. Après incubation, des dilutions convenables du mélange des souches donatrice et réceptrice sont étalées sur un milieu permettant soit de sélectionner soit de détecter les clones d'organismes produits par recombinaison ou par transfert de l'épisome. En outre, le milieu d'étalement est choisi de façon à éliminer la souche donatrice Hfr ou F' soit par omission d'un des facteurs nécessaires à sa croissance, soit par addition de streptomycine (20 mgr/L) ou étalement de bactériophage T_6 (2.10^{10} phages/boîte) pour les souches sensibles à l'un de ces agents.

Enfin, dans les cas où l'introduction d'un épisome FLac ne provoque pas de changement de phénotype de la souche réceptrice, le mélange des souches F^- et F' est étalé sur bouillon gélosé additionné d'un agent éliminant la souche F'. Après croissance, les colonies sont répliquées, suivant la technique de Lederberg (19), à la surface d'un milieu gélosé couvert d'une couche de bactéries F^-, le milieu étant choisi de façon à ne permettre ni la croissance de la souche F^- étalée à sa surface ni la croissance des colonies répliquées. Dans ces conditions, l'apparition d'une colonie par réplique sera due à des recombinants apparus à la faveur d'un transfert d'épisome. Cette

technique permet donc de distinguer les colonies de souches F^- de celles de souches hébergeant un épisome.

e) Traitement à l'acridine.

Afin d'éliminer l'épisome de souches F' celles-ci sont traitées à l'acridine orange suivant la technique décrite par Hirota (2), les colonies de souches F^- étant distinguées des bactéries F' résiduelles par réplique sur une couche de bactéries F' convenables, tel qu'il est décrit ci-dessus.

f) Détection de souches constitutives par coloration au "Fast Blue".

La technique décrite ci-dessous permet la coloration sélective de colonies d'organismes synthétisant constitutivement la β-galactosidase. Elle est basée sur le même principe que la technique utilisée pour déceler les colonies de souches produisant de la phosphatase alcaline et que celle développée par Messer et al. (21) pour mettre en évidence des mutants auxotrophes. La β-galactosidase hydrolyse le 6-bromo-2-α-napthyl-β-galactoside libérant de l'α naphtol qui, couplé in situ avec un sel diazonium, forme un colorant axoïque insoluble. Le milieu tryptone utilisé ne contenant pas d'inducteur de la β-galactosidase, les colonies de bactéries constitutives seront seules colorées. Le colorant azoïque formé étant insoluble, il ne diffuse pas mais reste localisé dans la colonie positive, ce qui permet d'examiner un grand nombre de colonies par boîte. Le colorant utilisé, "Fast Blue" RR, étant toxique il est important de prélever les colonies désirées après un temps de coloration très bref n'excédant pas 5 minutes. La sensibilité de la méthode est telle que nous ne pouvons distinguer, dans une expérience de reconstruction, un organisme possédant une activité constitutive de 5000 unités/mgr de β-galactosidase (mesurée après croissance en milieu minimum) d'un organisme possédant seulement 150 Unités/mgr de cette enzyme. C'est ce qui nous a amené à utiliser cette méthode pour déterminer la fréquence des mutations constitutives i^- ou o^c sans avoir à craindre de fournir un avantage sélectif aux mutants à haute activité enzymatique.

Milieux et solutions.

- Milieu "tryptone" gélosé de composition: tryptone 10 gr; NaCl 9 gr; bacto agar 10 gr; eau 1 litre.

- Tubes contenant 2 ml de gélose de composition: tryptone 15 gr; yeast extract 3 gr; NaCl 5 gr; bacto agar 7 gr; eau 1 litre.

- Tampon Tris 1 M pH 8

- NaCl: 9 gr/L

- 6-bromo-2-α-naphtol β-galactoside (BNG): 0,5 gr/L

- "Fast blue" RR salt (FB): 20 mgr/ml (ne se conserve pas)

Mélanger extemporanément BNG + FB + Tris dans les proportions 8 : 2 : 1 et conserver ce mélange dans la glace pendant un temps n'excédant pas 20 minutes.

Mode opératoire

Etaler sur chaque boîte de milieu tryptone un tube de gélose contenant environ 5.10^4 bactéries. Couvrir cette couche de gélose par étalement d'un second tube de gélose, stérile cette fois. Incuber les boîtes à 37^o pendant 15 à 20 heures. Couvrir leur surface, après incubation, à l'aide de 3 ml du mélange BNG + FB + Tris. Eliminer ce mélange après 3 minutes de contact et laver la surface des boîtes à l'aide de 5 ml de solution de NaCl. Les colonies de bactéries ayant une activité constitutive de β-galactosidase, apparaissant alors colorées en bleu très foncé alors que les bactéries inductibles ou Lac^- donnent lieu à des colonies d'un brun clair. On prélève immédiatement les colonies désirées à l'aide d'une pipette capillaire, et les transfert dans un tube de gélose, étalé ensuite sur une boîte de milieu tryptone qui sera traitée après incubation de façon identique à celle décrite ci-dessus. Cette seconde coloration n'est toutefois nécessaire que si la colonie prélevée était en contact avec d'autres colonies ou présentait une coloration d'intensité douteuse. Si une colonie bien isolée et colorée a été prélevée il suffit de reprendre au fil de platine quelques unes des colonies apparaissant sur la deuxième boîte de milieu tryptone et de les inoculer à la surface de bouillon gélosé. Après croissance, cette boîte est répliquée sur différents milieux synthétiques gélosés afin de vérifier si les souches retenues exigent les mêmes facteurs que la souche parente et confirmer leur constitutivité par leur vitesse d'hydrolyse de l'o-nitrophenyl β-D-galactoside.

II. Techniques biochimiques

a) Dosages enzymatiques.

Toutes les déterminations d'activités enzymatiques ont été réalisées dans des extraits de bactéries prélevées au cours de leur phase exponentielle de croissance dans le milieu minimum indiqué pour chaque expérience. Toute culture réalisée en présence d'une concentration en inducteur supérieure à 10^{-3}M est centrifugée avant préparation de l'extrait bactérien. La concentration en bactéries des cultures est mesurée par leur densité optique soit à 600 mμ au colorimètre "Jean et Constant" ou "Spinco", soit à 450 mμ au spectrophotomètre Zeiss. Les valeurs de densité optique ainsi mesurées sont converties en mgr (poids sec) de bactéries par ml de culture en utilisant la relation:

$$1 \text{ mgr bact/ml (poids sec)} = 1{,}6.10^{9} \text{ bact/ml} = 400 \text{ Jean et Constant}_{600\ m\mu} = 640 \text{ Spinco}_{600\ m\mu} = 5.0 \text{ Zeiss}_{450\ m\mu}$$

Dosage de la β-galactosidase

Ce dosage est effectué sur les suspensions bactériennes traitées au toluène (1%) et désoxycholate (0,01%) pendant une heure à 37° avec agitation. La méthode employée est essentiellement celle décrite par Cohn et Monod (22) avec la modification apportée par Horiuchi et al. (23) substituant à la mesure cinétique de l'hydrolyse de l'orthonitrophényl-β-D-galactoside la mesure unique de la densité optique à 420 mμ après incubation à 28° pendant un temps mesuré. L'unité d'activité de β-galactosidase est la quantité d'enzyme hydrolysant 1 mμM/min d'ONPG dans les conditions du dosage.

Dosage de la β-galactoside perméase

Ce dosage se fait par mesure de l'accumulation de méthyl β-D-thiogalactopyranoside (TMG) marqué par C^{14} dans le méthyl par une suspension bactérienne additionnée de chloromycétine. La technique utilisée est celle décrite par Kepès (24). L'unité d'activité de la β-galactoside perméase est la quantité d'enzyme permettant l'accumulation de 1 mμM/min de TMG dans les conditions du dosage.

Dosage de la thio galactoside transacétylase

La méthode utilisée, non publiée, a été mise au point par Claude Burstein, dont nous avons reçu une préparation d'acétyl coenzyme A kinase de levure et que nous remercions vivement. Elle a pour principe la mesure de vitesse de formation de 6-acétyl C^{14}-IPTG par un extrait enzymatique incubé en présence d'IPTG et d'un système générateur d'acétyl C^{14}-CoA, suivie de l'extraction sélective du 6-acétyl IPTG par l'alcool isomylique en milieu alcalin. Une culture de bactéries en croissance exponentielle est additionnée de chloramphénicol (50 µgr/ml) et traitée au toluène (1%) et désoxycholate (0,01%) pendant une heure à 37°. Elle est ensuite chauffée pendant 10 minutes à 75° afin de détruire l'activité des déacétylases qui hydrolyseraient l'acétyl-coenzyme A formé au cours de la réaction. Un traitement de 30 min. à 30°C par 1 µgr/ml de désoxyribonucléase disperse les agrégats et diminue la viscosité de l'extrait.

On incube pendant une heure à 30° 0.1 ml du mélange suivant:

Tampon aux phosphates de K pH 7.5	10^{-1}M)	
$McCl_2$	5.10^{-3}M)	
ATP - sel de K ajusté à pH 7,5	10^{-2}M)	dans un
Glutathion réduit - pH 6,5	10^{-2}M)	volume total
Coenzyme A - pH 6,5	5.10^{-4}M)	de 70 µL
IPTG	2.10^{-1}M)	
KF	5.10^{-2}M)	
Acétate de Na marqué au C^{14} (12.5 µc/µM)	10^{-3}M)	
Préparation d'acéto-CoA kinase de levure selon Berg (25)	4µL	
Extrait bactérien à doser	30µL	

La réaction est arrêtée par addition de 0,2 ml d'éthanol (95°) contenant NH_4OH 0,4 N, et le 6-acétyl C^{14}-IPTG est extrait par agitation en présence de 2 ml d'alcool isoamylique saturé d'eau. Après centrifugation une prise de 0.1 ml de l'extrait isoamylique surnageant est déposée sur une coupelle destinée aux échantillons radioactifs, additionnée de 0,05 ml d'acide acétique glacial et placée pendant une heure à l'étuve à 80° afin d'éliminer l'acétate radioactif contaminant. La radioactivité des échantillons est alors mesurée au compteur Geiger pour déterminer la quantité de 6-acétyl C^{14} IPTG formée sous l'ac-

tion de la thiogalactoside transacétylase. L'unité d'activité est la quantité d'enzyme produisant 1 mμM de 6-acétyl IPTG par minute dans les conditions du dosage.

b) Chromatographie. (26, 27)

La séparation chromatographique des sucres sur papier a été réalisée par migration pendant 30 heures dans une phase descendante du mélange solvant butanol normal-pyridine-eau dans les proportions 6-4-3. Des échantillons de lactose, glucose et galactose soumis au même procédé servent de témoins.

La présence des sucres est ensuite révélée par vaporisation du mélange suivant:

500 ml butanol normal saturé d'eau
8,3 gr acide phtalique
4,65 gr aniline

Après chauffage pendant 5 minutes au four à 100° des taches violettes apparaissent à l'emplacement des sucres réducteurs.

III. Produits chimiques

Les abbréviations utilisées sont réunies en page 100.

Sels minéraux.

Tous les sels minéraux utilisés sont de qualité analytique et préparés par Mallinckrodt.

Milieux de culture.

Tous les produits utilisés dans la préparation des milieux de culture non synthétiques sont de marque Difco.

Sucres:

Glucose	Mallinckrodt
Lactose)	
Mélibiose)	Pfanstiehl
Galactose	Sigma
β-BNG	Sigma ou Pierce
IPTG)	
TMG)	Mann
ONPG	Calbiochem
n-PTG)	
Bu TG)	
β MG)	Synthétisés par Türk
Fluoro-β-D-galactoside)	
Phényl-β-D thioglucoside)	
Cyclohexyl-β-D-thiogalactoside)	
GTG	Don de Claude Burstein

Produits organiques divers

TTZ: (2-3-5 triphényl tétrazolium chloride)	Matheson Coleman and Bell
Tris: (Tris (hydroxyméthyl) amino méthane) Trisma Base	Sigma
NG:	Aldrich Chemical Co.
Fast Blue RR salt	Sigma
Sm	Squibb
L arginine)	
L thréonine)	
L leucine)	
L histidine)	Calbiochem
L tryptophane)	
L méthionine)	
Thiamine hydrochloride	Nutritional Biochemicals
Acridine Orange	Gurr
Na Succinate	Eastman Kodak
Adénine	P.L. Biochemicals Inc.
Glycérol	Baker Chemicals

CHAPITRE III

ETUDE DE MUTANTS SURREPRIMES (i^S)

I. Introduction

La première partie du travail expérimental présenté dans ce mémoire dérive directement de la découverte par Jacob et Monod (1, 2, 28) de mutants surréprimés (i^S) dont les propriétés furent précisées par Willson et al. (29). Rappelons que ces mutants sont incapables de synthétiser la β-galactosidase (Z), la galactoside perméase (Y) et la thiogalactoside transacétylase (A) en présence de lactose ou d'IPTG 10^{-3}M, donc phénotypiquement lactose négatif. Cette propriété est dominante dans un diploïde portant à la fois le gène muté et l'allèle normal, ce qui la distingue des mutations touchant les gènes de structure de z et y. Enfin, le fait que les mutants lactose positif isolés à partir de ces organismes sont constitutifs, et leur localisation génétique dans le gène i indiquent que les mutations i^S touchent le gène régulateur de l'opéron Lac.

Nous décrirons dans ce chapitre l'isolement de nouveaux mutants du type i^S et l'étude de l'expression de ces mutations et de leur réversion chez l'ensemble des mutants i^S.

II. Isolement de mutants i^S

La plupart des mutants de phénotype Lac^- que l'on obtient à partir d'organismes Lac^+ sont le résultat de mutations dans l'un des gènes de structure z ou y. Parmi 800 mutants Lac^- analysés, Jacob et Monod n'ont décelé que 2 mutants présentant les caractéristiques des mutants i^S. La méthode d'isolement de mutants i^S décrite ci-dessous exploite leur propriété d'être dominants dans les organismes diploïdes portant à la fois les allèles i^S et i^+. Nous avons utilisé comme souche parente une bactérie portant le génome Lac^+ ($i^+z^+y^+a^+$) dans le chromosome et hébergeant un épisome Lac^+ ($i^+z^+y^+a^+$). Nous représenterons le génome de cette bactérie, diploïde pour la région Lac, par la notation $i^+z^+y^+a^+/Fi^+z^+y^+a^+$. L'emploi d'un tel parent Lac^+ diploïde doit nous permettre de déceler les mutants Lac^- dominants du type i^S à l'exclusion des mutants z^- ou y^- récessifs par rapport à leur allèle sauvage.

Cette méthode s'est avérée efficace quoiqu'imparfaite dans la mesure où

les mutations z^- ou y^- peuvent s'exprimer dans les bactéries qui ont perdu l'épisome ou subi l'intégration de cette mutation dans le chromosome. La détection de mutants z^- ou y^- nécessite cependant toujours un événement génétique double donc peu fréquent. Une analyse qualitative préliminaire de la dominance de tous les mutants Lac^- ainsi isolés permet de les exclure. Enfin, il convient d'exclure également les mutants incapables d'utiliser tous les hexoses, y compris le glucose, à cause de mutations apparues non dans la région "Lac" mais dans une région du chromosome pour laquelle l'organisme est haploïde. Ces mutations, fréquemment observées, ne seront pas discutées dans ce travail.

La technique utilisée consiste à traiter des bactéries diploïdes $i^+z^+y^+a^+/Fi^+z^+y^+a^+$ par un agent mutagène, soit rayons U.V., soit nitrosoguanidine,puis, après croissance en bouillon des bactéries traitées, à étaler des dilutions convenables sur des boîtes indicatrices contenant du lactose, soit EMB, Mac ou TTZ. Un lot de boîtes est incubé à 32^o, l'autre à 42^o, afin de repérer éventuellement des mutants où l'expression de la mutation i^s dépendrait de la température. Toutes les colonies Lac^- qui apparaissent sur ces boîtes sont prélevées, réisolées et analysées comme suit.

Mutants isolés après irradiation U.V.

Dans une première expérience, nous avons utilisé la souche Sm^r 2000m/$FLac^+$. Une culture en bouillon a été centrifugée et lavée au milieu 63. Une suspension en milieu 63 de ± 2.10^8 bactéries/ml a été soumise au rayonnement ultraviolet dans des conditions où le taux de survie est de 0,1 à 1% environ. Après irradiation, les bactéries ont été inoculées dans 5 tubes de bouillon et mises en croissance pendant 15 heures. Des dilutions de ces 5 cultures ont été étalées sur 3 boîtes EMB lactose de façon à inoculer environ 5,000 bactéries par boîte; sur ces 15 boîtes 60 colonies apparaissant blanches ou roses pâles ont été prélevées dont 15 se sont avérées, après réisolement, être blanches sur EMB lactose. Dans la plupart des cas, ces colonies blanches segrègent des organismes lactose positifs. Après plusieurs réisolements, ces souches segrégantes ont été obtenues sous la forme lactose négative stable soit par intégration de la mutation Lac^- dans les deux génomes soit par perte de l'épisome. Ces souches ont été soumises aux analyses suivantes:

1. Essai de croissance en milieu liquide synthétique additionné des aci-

des aminés exigés pour la croissance de la souche parente et soit de glycérol, soit de glucose, comme seule source carbonée.

2. Croisement avec la souche Sm^s 200 PS/FLac$^+$ et étalement sur boîtes EMB lactose Sm. Les souches devenues haploïdes au cours de l'isolement et portant une mutation Lac$^-$ récessive donnent lieu à l'apparition de colonies Lac$^+$ après réception de l'épisome FLac$^+$. Les souches devenues haploïdes et portant une mutation i^s resteront Lac$^-$, mais ségregeront des organismes Lac$^+$ après réception de l'épisome FLac$^+$. Les souches diploïdes resteront inchangées.

3. Croisement avec la souche réceptrice 2000k ($i^+z^+y^+a^+$) et étalement sur boîtes de milieu synthétique glucosé additionné des acides aminés exigés pour la croissance de la souche réceptrice. 40 colonies sont prélevées et leur phénotype Lac$^+$ ou Lac$^-$ déterminé sur boîte EMB Lac. Dans le cas des mutants portant dans leur épisome une mutation Lac$^-$ dominante, une proportion élevée des colonies analysées sont des organismes diploïdes Lac$^-$ segrégant des bactéries Lac$^+$. Si l'épisome transféré porte une mutation Lac$^-$ récessive, il ne changera pas le phénotype Lac$^+$ de la souche réceptrice, mais provoquera l'apparition de rares organismes Lac$^-$ au sein des colonies Lac$^+$, ceci par intégration de la mutation Lac$^-$ dans le chromosome de la souche 2000k. Les mutants donnant lieu à ce résultat ont été soumis à l'analyse suivante:

4. Croisement avec les souches réceptrices Lac$^-$

   C_{600} de génome $i^+z^+y^-$
   2340 de génome $i^-z^-y^+$
   2000 X_2 portant une délétion de y et d'une partie de z

Après croisement, des dilutions sont étalées sur milieu synthétique contenant du lactose et les acides aminés exigés pour la croissance de la souche réceptrice. L'apparition d'organismes Lac$^+$ à haute fréquence par complémentation, ou à basse fréquence par recombinaison entre l'épisome du mutant et la souche réceptrice, nous permet de caractériser la mutation z^- ou y^- portée par l'épisome analysé.

5. Dosage de la β-galactosidase afin de confirmer et compléter cette analyse.

Les résultats de l'analyse des mutants obtenus au cours d'une semblable expérience sont résumés dans le tableau II, page 24.

L'expérience résumée dans le tableau II nous a fourni 3 mutants de type i^s:

2000m2A/F2A
2000m14A/F14A
2000m16Z/F16Z

Les souches 14A et 16Z, provenant de la même culture après irradiation (No. 4), pourraient être le même mutant. Nous les avons toutefois étudiées séparement. Dans la suite de nos expériences d'isolement de mutants i^s, nous avons utilisé comme souche parente $C_{6000}/FLac^+$, sensible à la streptomycine et de génome "Lac" $i^+z^+y^+/Fi^+z^+y^+$. Ceci, d'une part parce qu'il s'est avéré à l'analyse que la souche 2000m/$FLac^+$ portait déjà une mutation i^- sur le chromosome, d'autre part l'emploi d'une souche sensible à la streptomycine présente une avantage technique, étant aisément éliminée après croisement.

Au cours de 6 expériences d'irradiation U.V. de la souche $C_{6000}/FLac^+$, suivies d'un total de 215 cultures indépendantes étalées sur 850 boîtes indicatrices EMB ou Mac au lactose, nous avons récolté 3 nouveaux mutants i^s:

$C_{6000}43/F43$
$C_{6000}44/F44$
$C_{6000}45$ obtenu sous forme haploïde

Soulignons que, dans chacune de ces expériences, nous avons incubé un lot de boîtes à 32^o et un lot de boîtes à 42^o, sans avoir jamais obtenu de mutant où l'expression de la mutation i^s dépendait de la température de croissance.

Mutants isolés après traitement à la nitrosoguanidine

Nous avons utilisé essentiellement les conditions de traitement à la N-méthyl-N'-nitro N-nitrosoguanidine (NG) décrites par E.A. Adelberg et al.(30) légèrement modifiées. Les bactéries récoltées d'une culture en croissance

TABLEAU II

No. mutant	No. culture après U.V.	Croisement avec les souches					Conclusion
		200 PS/FLac$^+$	2000k	C_{600}	2340	2000X2	
2A	2		dominant				i^s
6	4				z^- ≠ z^-_4	z^- dans Δ X2	z^-
13	4	haploïde récessif					haploïde y^-
14A	4		dominant				i^s
15	5	haploïde récessif					haploïde y^-
16Z	4		dominant				i^s
17	1			y^-			y^-
18	2			y^-			y^-
19	2				z^- ≠ z^-_4	z^- dans Δ X2	z^-
20	5					z^- hors Δ X2	z^-
21	5			y^-			y^-

Analyse d'une expérience d'isolement de mutants i^s

Résultats de l'analyse des divers mutants Lac^- obtenus au cours d'une expérience d'isolement de mutants i^s après action de radiations U.V. sur la souche 2000m/$FLac^+$. Voir détails dans le texte.

exponentielle en bouillon de la souche $C_{6000}/FLac^+$ sont mises en suspension à raison de 5.10^8 bactéries par ml environ dans le tampon à pH 6.0 décrit par ces auteurs, additionné de 600 µgr/ml de NG. Après 30 min de traitement à 37°, les bactéries sont filtrées sur filtre millipore, lavées et mises en croissance en bouillon pendant une heure avant d'être étalées en nappe sur des boîtes indicatrices au lactose, TTZ ou EMB, à raison d'environ 500 par boîte. Nous avons vérifié dans plusieurs de ces expériences l'apparition d'un nombre élevé de mutants ayant acquis ou perdu certaines exigences afin de nous assurer de l'efficacité du traitement mutagène. L'isolement de 2 nouveaux mutants i^s indépendants fut le résultat de 26 traitements à la NG étalés sur un total de 900 boîtes indicatrices au lactose. Ces mutants ont été triés parmi de nombreux mutants Lac^- non dominants ou glucose négatif en les soumettant aux épreuves décrites précédemment pour les mutants obtenus après irradiation U.V. Cet ensemble d'expériences utilisant la nitrosoguanidine comme agent mutagène ne nous a pas fourni, plus que celles d'irradiation U.V., de mutation i^s sensible à la température de croissance.

III. Expression des mutations i^s

Les expériences décrites ci-dessous clarifient certains aspects du comportement des mutants i^s utiles à l'interprétation de la nature de cette mutation. Elles ont permis d'éliminer un certain nombre d'hypothèses selon lesquelles la mutation i^s ne toucherait pas directement la structure du répresseur, et conduisent à se représenter plus précisément quelle est cette structure et comment elle peut être altérée.

Nous avons examiné les 8 mutants i^s dont l'isolement vient d'être décrit ainsi que les deux mutants i^s (Y18 et 694) obtenus par Jacob et Monod et un mutant (Z135) obtenu après traitement à la NG d'une souche Hfr H $tryp^-$ (Ca 79) par Zipser, que nous remercions de nous avoir confié ce mutant.

Il a été nécessaire pour certaines de ces expériences d'incorporer les mutations i^s dans l'épisome F'Lac. A cet effet nous avons transféré un épisome de type $Fi^+o^cz^+y^+$ dans 3 souches i^s obtenues sous forme haploïde (2000mY18, 2000mYA694 et $C_{6000}45$), cultivé les diploïdes $i^s/Fi^+o^cz^+y^+$ phénotypiquement Lac^+ ainsi obtenus et étalé ces cultures sur boîtes indicatrices au lactose. Ces souches segrègent des colonies Lac^- qui sont réisolées et parmi lesquelles on choisit une souche diploïde ayant incorporé la mutation i^s dans l'épisome.

Cette opération nous a donc procuré les souches suivantes:

2000mY18/FY18
2000mYA694/FYA694
C_{6000}45/F45

Enfin toutes les mutations i^s ont été transférées dans la souche $C_{6000}Sm^s$ de façon à pouvoir comparer leurs propriétés dans des bactéries isogéniques sauf pour la mutation étudiée. Les souches $C_{6000}i^s/Fi^s$ ainsi obtenues ont été rendues haploïdes par traitement à l'acridine orange mettant ainsi à notre disposition une collection de mutants i^s haploïdes ou diploïdes tous apparentés à la souche $C_{6000}Sm^s$.

Effet pléiotrope de mutations i^s

Les mutants i^s que nous avons isolés ayant été sélectionnés d'après leur phénotype Lac^- sur boîtes indicatrices au lactose, nous attendons évidemment que le lactose soit incapable d'induire la β-galactosidase et/ou la galactoside perméase nécessaires au métabolisme de ce sucre. Si cette déficience est due à une mutation dans le gène régulateur i, elle doit affecter également l'induction des 3 enzymes connus de l'opéron lactose, notamment l'induction de la galactoside transacétylase: ceci a été vérifié chez les 3 premiers mutants i^s obtenus.

Les résultats, résumés dans le tableau III, page 27, indiquent que le lactose est, en effet, incapable d'induire la β-galactosidase et la transacétylase chez ces mutants. Ce comportement n'est pas dû à une déficience au niveau de la perméase puisque l'IPTG 10^{-3}M induit chez ces i^s la synthèse de perméase en même temps que celle de la β-galactosidase et de la transacétylase. Ces 3 mutants i^s sont en celà différents de ceux étudiés par Willson et al. (29) lesquels ne produisent aucune de ces trois enzymes en quantité décelable en présence d'IPTG 10^{-3}M. Ceci nous a conduit à analyser les caractéristiques d'induction de tous les mutants i^s par différents galactosides capables d'induire les enzymes de l'opéron lactose chez des bactéries de type sauvage i^+ et, éventuellement, par différentes concentrations de ces inducteurs.

TABLEAU III

Génome	β-galactosidase			β - galactoside perméase		Thiogalactoside transacétylase		
	sans ind.	IPTG 10^{-3}M	Lac 10^{-2}M	sans ind.	IPTG 10^{-3}M	sans ind.	IPTG 10^{-3}M	Lac 10^{-2}M
$i^+z^+y^+$	3	6400	1500	1	10,9	~0,001	0,264	0,149
$i^s{}_{2A}z^+y^+$	15	5170	97	1,8	15,4	<0,001	0,415	0,004
$i^s{}_{14A}z^+y^+$	4	3500	10	1,3	18,4	~ 0,001	0,349	0,003
$i^s{}_{16Z}z^+y^+$	6	6700	10	0,5	3,1	~0,007	0,602	0,001

Effet pléiotrope de mutations i^s

Induction des 3 enzymes de l'opéron lactose chez les mutants surréprimés 2000m2A, 2000m14A et 2000m16Z et la souche sauvage 2000m. Les croissances ont été réalisées en milieu minimum 63 au glycérol additionné ou non d'inducteur. Les résultats sont exprimés en unités par mgr de bactéries, telles qu'elles sont définies au Chapitre II.

Spectre d'induction des mutants i^s

Après avoir vérifié que les mutations considérées touchaient les propriétés d'induction des 3 enzymes de l'opéron Lac, nous nous sommes contentées dans la suite de cette étude physiologique de doser l'activité de la β-galactosidase. Le tableau IV, page 29, résume les résultats d'induction à 37°C de la β-galactosidase par divers galactosides chez tous les mutants i^s comparés à une souche de type sauvage i^+.

Remarquons que chez la souche parente C_{6000} ($i^+z^+y^+$) utilisée, la concentration 10^{-5}M de glycérol β-D-thiogalactoside (GTG) n'est plus saturante, c'est-à-dire que ce sucre n'est pas meilleur inducteur que l'IPTG ou le TMG, contrairement aux observations faites par C. Burstein chez une autre souche (31). En plus des inducteurs cités au tableau IV nous avons examiné le pouvoir inducteur de quelques sucres connus (32, 33) comme induisant pauvrement ou pas la β-galactosidase chez les bactéries i^+ et trouvé qu'ils étaient incapables d'induire cette enzyme chez les souches i^s; tel est le cas du phényl β-D-thiogalactoside, cyclohexyl β-D-thiogalactoside, galactose β-D-thiogalactoside, phényl β-D-thioglucoside, 1-fluoro-β-D-galactoside et du galactose.

L'ensemble des données ainsi réunies permet de conclure que les mutations i^s étudiées n'introduisent pas de changement qualitatif du pouvoir inducteur des divers sucres considérés, mais seulement des changements quantitatifs du niveau d'induction atteint en présence de ces sucres à la concentration 10^{-3}M. Les différentes mutations i^s diminuent à divers degrés la capacité générale d'induction en sorte que, l'ordre d'efficacité des inducteurs étant conservé tel qu'il apparaît chez les bactéries i^+, on peut classer les mutants i^s par ordre décroissant d'inductibilité. Cet ordre, adopté au tableau IV, va d'une induction normale par l'IPTG 10^{-3}M (mutant 2A) à une perte totale de la capacité d'être induit par aucun des inducteurs essayés (mutant N_1, par example).

On voit, en outre, que le niveau de base d'activité, c'est-à-dire le niveau atteint en absence d'inducteur, est identique chez les i^s et la souche i^+. Ceci, ajouté aux changements quantitatifs de la capacité d'induction, variable d'ailleurs d'un i^s à l'autre, confirme l'hypothèse selon laquelle ces mutations diminuent dans diverses mesures l'affinité du répresseur pour l'inducteur sans affecter son affinité pour l'opérateur. Il est légitime de se demander si ces répresseurs mutés R^s ne révéleront pas également un changement

TABLEAU IV

Gène i	sans ind.	IPTG 10^{-1}M	IPTG 10^{-3}M	nPTG 10^{-3}M	TMG 10^{-3}M	BuTG 10^{-3}M	GTG 10^{-3}M	GTG 10^{-4}M	GTG 10^{-5}M	βMG 10^{-3}M	Lac 10^{-3}M	Meli 10^{-3}M
i^+	3	-	4120	5500	4420	4150	3910	3740	2670	845	695	715
i^s 44	3	-	3670	3070	2780	3020	-	201	-	114	230	2
i^s 2A	3	-	3840	3320	2040	1410	-	283	-	77	89	3
i^s 16Z	2	-	3690	2840	3060	610	-	400	-	37	13	2
i^s14A	3	-	4390	3140	2830	500	-	372	-	28	17	2
i^sN_2	5	2780	18	10	6	3	4	3	-	7	4	6
i^s 43	3	1010	3	3	3	3	3	2	-	4	3	3
i^s Y18	3	162	4	4	6	3	3	3	-	6	11	5
i^s YA694	3	150	3	3	3	< 1	-	-	-	2	3	3
i^s 45	3	8	6	3	3	2	3	3	-	3	2	2
i^s N_1	5	2	2	2	6	2	2	2	-	5	5	5
i^s Z135	4	6	6	5	5	4	5	4	-	5	5	4

Spectre d'induction des mutants i^s

Induction de la β-galactosidase par différents inducteurs chez les mutants i^s et une souche sauvage i^+ en croissance exponentielle en milieu minimum 63 au glycérol. Résultats exprimés en unités par mgr de bactéries.

d'affinité pour l'opérateur à la faveur, par exemple, d'une élévation de température. Leur structure anormale pourrait, en effet, les rendre plus thermolabiles que le répresseur de type sauvage R^+ et entraîner une synthèse partiellement constitutive à haute température comme c'est le cas d'un mutant décrit par Horiuchi et Novick (14).

Effet de la température sur la synthèse de β-galactosidase par les mutants i^s.

Nous avons déterminé après croissance à 30° et 42° des souches i^s et i^+ le taux de β-galactosidase synthétisée en absence d'inducteur et en présence d'IPTG à une concentration différente pour chaque i^s. Ces résultats sont réunis au tableau V, page 31.

Il est clair qu'aucun des mutants i^s n'est constitutif à 42°. Le niveau de base de β-galactosidase passe d'environ 4 unités à 30° à une vingtaine d'unités à 42°, celà tant chez la souche i^+ que chez les i^s. Cette augmentation avec la température du niveau de base des i^+, tout comme celle du niveau d'induction maximum, pourrait, par exemple, être due à la présence de bactéries polyploïdes dans ces conditions de croissance. Le milieu 63 au glycérol ne permettant qu'une croissance extrèmement lente à 30° et, surtout, à 42° nous l'avons additionné de 10% du volume de bouillon, ce qui permet aux bactéries de doubler leur masse en 70 minutes à 30° et en 90 minutes à 42°. La présence de plusieurs chromosomes par cellule dans ces conditions expliquerait ces résultats dont les valeurs absolues sont d'autant moins comparables à celles obtenues précédemment que nous n'avons pas corrigé le facteur de conversion densité optique → mgr de bactéries/ml pour ces nouvelles conditions de croissance. La comparaison des valeurs obtenues pour i^+ et i^s est toutefois valable et permet de conclure que les mutations i^s obtenues touchent une région de la molécule de R qui n'intéresse pas son site opérateur et n'augmente pas sa thermolabilité. Il est intéressant de constater, d'autre part, que les i^s sont inductibles à 42° par des concentrations d'IPTG totalement inefficaces à 30°. En termes du modèle présenté au chapitre I, ce phénomène pourrait signifier que la chaleur modifie la structure du répresseur de façon à changer l'affinité relative de ses formes R et T vis-à-vis de l'IPTG ou de l'opérateur. Des mesures précises de Km apparent pour l'IPTG aux différentes températures chez des souches i^+ et i^s pourront seules établir ce fait. De telles déterminations s'avèrent difficiles pour les souches i^s les plus surréprimées, c'est-à-dire celles où cet effet éventuel serait le plus spectaculaire. Leur phéno-

TABLEAU V

Gène i	30° Sans inducteur	30° ← 10^{-1}M	30° +IPTG 10^{-2}M	30° → 10^{-4}M	42° Sans inducteur	42° ← 10^{-1}M	42° +IPTG 10^{-2}M	42° → 10^{-4}M
i^+	3	-	6.470	6.940	14	-	14.686	20.390
2A	5	-	-	11.540	23	-	-	26.910
44	5	-	-	8.250	22	-	-	10.880
14A	5	-	-	4.450	19	-	-	26.750
16A	5	-	-	4.730	12	-	-	15.780
N_2	5	-	11	-	24	-	8.600	-
43	5	-	13	-	16	-	6.550	10
Y18	5	-	3	-	18	-	170	-
45	4	7	-	-	15	190	-	-
N_1	5	6	-	-	12	64	-	-
Z135	7	6	-	-	6	11	-	-

Effet de la température sur la synthèse de β-galactosidase par les mutants i^s.

L'activité spécifique de la β-galactosidase (exprimée en U/mgr de bactéries) est mesurée dans des bactéries en croissance exponentielle à 30° ou à 42° en milieu 63 au glycérol contenant 10% du volume de bouillon et additionné ou non d'IPTG. Toutes les souches analysées sont isogéniques de type $C_{6000}i^s/Fi^s$ sauf la souche Hfr H Z135.

type Lac^- ne permettant pas, en effet, de déceler et isoler un double mutant à la fois i^S et y^- nécessaire à la mesure d'un Km, l'étude de cet effet n'a pas été poursuivie. Remarquons qu'il suggère l'existence éventuelle de mutants qui, inductibles à 37^O, n'exprimeraient leur génotype i^S qu'à basse température. Ce point sera discuté au chapitre VI.

Connaissant les caractéristiques d'induction des différents i^S nous avons ensuite étudié quantitativement leur dominance sur les allèles i^+ et i^- et leur comportement en présence d'un opérateur muté o^c.

Dominance quantitative des mutations i^S

Comme nous l'avons discuté dans l'introduction de ce chapitre, la caractéristique principale des mutations i^S est leur dominance sur l'allèle sauvage i^+ dans une bactérie diploïde portant les deux gènes i^+ et i^S. C'est sur la base d'une analyse préliminaire qualitative, (décrite en page 22) du caractère dominant des mutants obtenus, que les organismes étudiés ici ont été choisis parmi de nombreux mutants lactose négatifs de type z^- ou y^- récessifs par rapport aux allèles sauvages z^+ ou y^+ respectivement.

On peut prédire, en outre, que les mutations i^S n'interfèreront pas avec l'expression d'une mutation "opérateur constitutif" (o^c) dans un organisme diploïde de type $i^s o^+ z^+ y^+ / Fo^c z^+ y^+$ ainsi qu'il a déjà été démontré par Willson et al. (29) pour l'i^SY18. Le comportement constitutif des mutants o^c est attribué, en effet, à une altération du gène opérateur diminuant l'affinité du répresseur pour son site d'action. Il a été démontré (34) que les mutations o^c n'affectent que l'expression des gènes de structure situés sur le même chromosome, c'est-à-dire n'agissent qu'en position cis. Les mutants $i^+ o^c$ peuvent être induits à produire les enzymes de l'opéron Lac au niveau maximum atteint chez les bactéries de type sauvage, mais ceci, dans un cas étudié quantitativement (29), à une concentration en inducteur environ 100 fois inférieure à celle nécessaire à l'induction maximum d'une souche sauvage. Ce comportement, confirmé chez les i^S, constitue un argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle les mutants o^c portent un opérateur ayant une affinité diminuée pour le répresseur. Il nous a permis également de prouver que le répresseur de mutants i^S totalement non inductibles reconnaît cependant encore les inducteurs.

a) Analyse de diploïdes $i^+z^+y^+/Fi^sz^+y^+$

Le transfert dans une souche réceptrice de type sauvage $i^+z^+y^+$ de chacun des épisomes portant une mutation i^s pauvrement inductible par le BuTG (16Z et 14A) et par l'IPTG (N_2, 43, Y18, 45 et N_1) a permis de mesurer quantitativement la dominance de ces gènes i^s sur l'allèle i^+ dans les diploïdes $i^+z^+y^+/Fi^sz^+y^+$.

Les résultats, réunis au tableau VI, page 34, font ressortir clairement la dominance du génotype i^s sur l'allèle i^+, mais montrent que cette dominance n'est, toutefois, que partielle. Les souches diploïdes i^+/Fi^s étalées sur boîtes indicatrices au lactose sont phénotypiquement Lac^-, mais apparaissent très instables donnant lieu à des bactéries Lac^+ par perte de l'épisome ou incorporation du génotype i^+ dans les deux génomes. Quoique la fréquence d'apparition de bactéries i^+ ne semble pas assez élevée pour rendre compte de l'induction partielle des diploïdes i^+/Fi^s, nous avons cependant fait une expérience utilisant une souche "recombinaisons négatives" (Rec^-) permettant d'éliminer cette interférence.

b) Analyse de diploïdes $i^sz^+y^+Rec^-/Fi^+z^+y^+$

La tableau VII, page 35, permet de comparer la dominance sur le gène i^+ d'un épisome de génome i^s14A porté soit par une souche déficiente quant à son pouvoir de donner lieu à des recombinants (Rec^-) soit dans une souche se recombinant normalement (Rec^+). Les mutants Rec^-, découverts et étudiés par Clark et Margulies (35), ne donnent lieu qu'à un nombre très réduit de recombinants de type i^+/Fi^+ et expriment toutefois une dominance partielle du gène i^s, identique à celle observée chez une souche Rec^+.

L'inductibilité partielle de bactéries contenant dans leur cytoplasme à la fois les répresseurs de type sauvage et de type i^s ne semble donc pas être un artifice dû à des recombinants i^+/Fi^+ mais un phénomène réel et général à tous les mutants i^s étudiés puisqu'à présent. Il pourrait être dû à la formation d'un répresseur hybride par l'association de sous-unités R^+ avec des sous-unités R^s présentes dans le cytoplasme. Ce répresseur, de type $n(R^+R^s)$, aurait des propriétés d'induction intermédiaires entre celles des répresseurs $n(R_2^+)$ et $n(R_2^s)$. Ce point sera discuté dans la conclusion du chapitre III. Enfin, la dernière ligne du tableau VII montre que la synthèse constitutive de β-galactosidase due à une mutation o^c est exprimée en présence du gène muté i^s dans

TABLEAU VI

Souches	gène i chromo	gène i épi.	activité de β-galactosidase (U/mgr bact) sans ind.	+IPTG 10^{-3}M	+BuTG 10^{-3}M
C_{6000}	i^+	haplo.	2	4.420	4.150
C_{6000}/FLac$^+$	i^+	i^+	4	11.250	-
58/FLac$^+$	i^+	i^+	6	13.920	-
C_{6000}	16_Z	16Z	5	9.220	404
58	i^+	16Z	5	10.070	1.200
C_{6000}	14A	14A	4	9.900	350
58	i^+	14A	5	9.200	1.300
C_{6000}	N_2	haplo.	5	18	-
58	i^+	N_2	7	320	-
C_{6000}	43	43	5	5	4
58	i^+	43	6	385	147
C_{6000}	Y_{18}	Y_{18}	3	5	2
58	i^+	Y_{18}	5	321	200
C_{6000}	45	45	5	18	5
58	i^+	45	6	293	133
C_{6000}	N_1	haplo.	5	2	-
58	i^+	N_1	6	222	-

Dominance des mutations i^s sur l'allèle sauvage i^+.

Activité de la β-galactosidase chez la souche i^+58F^- hébergeant ou non un épisome $i^sz^+y^+$ comparée à l'inductibilité de cette enzyme chez des souches diploïdes de type i^s/Fi^s. L'activité spécifique de la β-galactosidase est mesurée dans des bactéries en croissance exponentielle en milieu minimum 63 au glycérol sans inducteur ou additionné d'IPTG ou de BuTG 10^{-3}M.

TABLEAU VII

gène Rec	génome Lac		Activité de la β-galactosidase (unités par mgr de bactéries)	
	Chromosome	épisome	sans inducteur	+butyl thio gal 10^{-3} M
+	$i^s z^+ y^-$	$i^+ z^+ y^+$	3	794
-	$i^s z^+ y^-$	$i^+ z^+ y^+$	3	679
-	$i^s z^+ y^-$	$i^s z^+ y^+$	2	61
-	$i^s z^+ y^-$	$i^+ o^c z^+ y^+$	2320	-

Dominance de la mutation i^s14A sur l'allèle sauvage i^+ dans une souche "recombinaison négative"

Activité spécifique de bactéries en croissance exponentielle en milieu minimum 63 au glycérol avec ou sans inducteur. Les souches utilisées sont 2000 m14A-1, un dérivé y^- de la souche 2000 m14A, portant ou non une mutation Rec^- et hébergeant un épisome de type $i^+ z^+ y^+$, $i^s_{14A} z^+ y^+$ ou $i^+ o^c z^+ y^+$. Le mutant Rec^- a été obtenu après traitement à la nitrosoguanidine. Il accepte normalement un épisome FLac mais ne donne lieu qu'à environ 1% des recombinants arg^+ observés chez la souche Rec^+.

la souche Rec^-. Les caractéristiques d'induction de divers diploïdes $i^{s\,+}z^+y^+/Fi^+o^cz^+y^+$ ont été analysées chez des souches Rec^+ et sont décrites ci-dessous.

c) Analyse de diploïdes $i^{s\,+}z^+y^+/Fi^+o^cz^+y^+$

Sur la base de ces données et des propriétés connues de diploïdes i^+/Fi^+o^c, quel comportement peut-on attendre d'un organisme diploïde de type $i^{s\,+}o^+/Fi^+o^c$? Si les mutants i^s produisent un répresseur altéré dans son affinité pour les inducteurs, mais non pour l'opérateur de type sauvage o^+, on prévoit ce qui suit:

1. que l'opérateur o^c aura une affinitée affaiblie pour le répresseur i^s tout comme pour le répresseur de type sauvage. En conséquence, la constitutivité de l'opérateur o^c sera exprimée en cis en présence d'un gène i^s tout comme i^+ placé en trans.

2. que la faible affinité de l'opérateur o^c pour le répresseur i^s rendra ce répresseur plus sensible à l'action des inducteurs, comme c'est le cas pour le répresseur de type sauvage. Les mutants i^s seront donc inductibles dans un organisme o^c à des concentrations en inducteur incapables d'induire les mutants i^s/Fi^+o^+.

La mutation o^c utilisée, obtenue par F. Jacob, est de type i^+o^c, c'est-à-dire porte le gène i^+ non altéré, puisque la souche homogénote $C_{600}o^c/Fo^c$ est induite à synthétiser le taux maximum de β-galactosidase en présence d'inducteur, comme le montre le tableau VIII, page 37. Pour cette raison il nous faut comparer l'inductibilité des diploïdes i^s/i^+o^c à celle de souches i^s/i^+o^+, tenant compte ainsi du fait que les mutations i^s ne sont que partiellement dominantes sur l'allèle sauvage i^+.

Les résultats obtenus, résumés au tableau VIII, confirment nos prévisions. On y voit l'expression du comportement constitutif d'un gène o^c porté par un épisome hébergé dans diverses souches i^s, ainsi que la réponse accrue à l'IPTG et au butyl thiogalactoside 10^{-3}M de ces i^s en présence de cet opérateur muté o^c. Les souches i^s45, Y18 et 43 notamment, qui ne sont que très faiblement induites par l'IPTG 10^{-3}M en présence d'un opérateur de type sauvage, sont beau-

TABLEAU VIII

Souche	chromo	épi.	Activité totale Sans ind.	+IPTG 10^{-3}M	+BuTG 10^{-3}M	Activité sans inducteur déduite +IPTG 10^{-3}M	+BuTG 10^{-3}M
C_{600}	i^+o^c	i^+o^c	3.950	11.150	13.700	7.200	9.750
C_{6000}	i^+o^+	haplo.	2	4.420	4.150	4.418	4.148
C_{6000}	i^+o^+	i^+o^c	1.180	10.880	-	9.700	-
2000m	16Z	i^+o^+	2	-	529	-	527
2000m	16Z	i^+o^c	2.560	-	4.660	-	2.100
2000m	14A	i^+o^+	4	8.080	-	8.070	-
C_{6000}	14A	i^+o^c	1.630	10.500	-	8.870	-
C_{6000}	43	i^+o^+	5	641	133	636	128
C_{6000}	43	i^+o^c	1.970	7.200	3.400	5.230	1.430
2000m	Y18	i^+o^+	3	366	118	363	115
C_{6000}	Y18	i^+o^c	1.500	4.560	1.820	3.060	325
C_{6000}	45	i^+o^+	2	339	-	337	-
C_{6000}	45	i^+o^c	2.570	6.200	-	3.620	-

Comportement de mutations i^s en présence d'un opérateur muté o^c (i^+o^c)

L'activité spécifique de la β-galactosidase (exprimée en U/mgr bact.) a été mesurée dans des bactéries en croissance exponentielle en milieu minimum 63 au glycérol additionné ou non de l'inducteur indiqué.

coup plus sensibles à cet inducteur dans une bactérie portant un opérateur altéré o^c. Il en est de même pour le BuTG dans le cas, notamment, des souches normalement induites par l'IPTG 10^{-3}M (16Z et 14A). Ceci dévoile la présence du site qui identifie les inducteurs chez le répresseur de chacune des souches i^s, y compris les i^s45 et N_1, qui n'avaient répondu à aucun des inducteurs essayés jusqu'à présent, même pas à une concentration 0,1M d'IPTG, (voir tableau IV). Il semble donc résulter des mutations i^s différentes affinités apparentes pour l'opérateur o^c, ce qui suggère que le répresseur reconnaît directement non seulement l'inducteur mais aussi l'opérateur.

Les organismes Lac^+ diploïdes i^s/Fo^c étalés sur boîtes indicatrices au lactose donnent lieu à de rares colonies d'organismes Lac^- soit par perte de l'épisome soit par incorporation du génome $i^s o^+$ dans cet épisome et élimination du génome $i^+ o^c$. Tous les mutants i^s portant un épisome Fo^c donnent lieu à l'apparition de dérivés Lac^- que nous avons réisolés et que nous avons soumis à l'épreuve de diploïdie par réplique tel qu'il est décrit au chapitre II. Dans tous les cas, nous avons obtenu des souches Lac^- diploïdes ayant incorporé le génome i^s dans l'épisome. Ceci confirme la localisation de ces mutations dans la région du chromosome portée par l'épisome, c'est-à-dire la région Lac et les segments de DNA immédiatement contigus puisque l'épisome utilisé ne porte pas d'autre gène connu que ceux gouvernant le métabolisme du lactose.

d) Analyse de diploïdes $i^s_{43} o^+ z^+ y^+ / Fi^- o^+ z^+ y^+$

Afin de compléter les données quantitatives montrant le comportement des mutations i^s en présence des divers allèles connus des gènes i et o, nous avons vérifié la dominance de la mutation i^s_{43} sur des allèles mutés i^- de type constitutif. Cette dominance, prédite par notre hypothèse de travail, a déjà été démontrée pour i^sY18 par Willson et al. (29). Nous avons choisi d'une part les mutations i^-_3 et i^-_{G23} dérivées d'une souche i^+ par F. Jacob, et d'autre part le double mutant $i^s_{43} i^-_{636}$, dérivé de la souche i^s_{43} et dont l'isolement et les propriétés sont décrites aux chapitres IV et V. Nos résultats sont réunis au tableau IX, page 39.

Remarquons tous d'abord que la dominance de i^+ sur i^- est nettement plus marquée si l'allèle i^+ est porté par l'épisome que par le chromosome: les activités spécifiques de β-galactosidase obtenues en absence d'inducteur sont de 73 U/mgr (i^-_3/Fi^+) et 675 U/mgr (i^+/Fi^-_3) respectivement sans jamais atteindre

TABLEAU IX

	Activité spécifique de β-galactosidase	
	Sans inducteur	+IPTG 10^{-4}M
I. Dominance de i^+ sur i^-		
$i^-{}_3/Fi^+$	73	5.590
$i^+/Fi^-{}_3$	675	7.220
II. Dominance de i^S sur i^-		
$i^-{}_3/Fi^S{}_{43}$	104	99
$i^S{}_{43}/Fi^-{}_3$	615	668
$i^S{}_{43}/Fi^-{}_{G23}$	502	665
$i^S{}_{43}/Fi^S{}_{43}i^-{}_{636}$	347	336
III. Témoins		
délétion "Lac" X74/Fi^+	6	5.690
" /$Fi^S{}_{43}$	5	4
" /$Fi^-{}_3$	8.110	7.350
" /$Fi^-{}_{G23}$	7.850	6.580
" /$Fi^S{}_{43}i^-{}_{636}$	6.000	6.090

Dominance de la mutation $i^S{}_{43}$ sur des allèles i^-.

L'activité spécifique de la β-galactosidase (U/mgr de bact.) a été mesurée dans des bactéries diploïdes en croissance exponentielles à 30°C en milieu 63 au glycérol, additionné ou non d'IPTG 10^{-4}M.

Les souches utilisées sont:

2300 e	$(i^-{}_3z^+y^+)$	de F. Jacob
2000 U118m	$(i^+z^0y^+)$	de F. Jacob
ΔX_{74} su^-	(dél."Lac")	dérivées de la souche FS26-19 (Lac^+ su^-) de Garen dans laquelle nous avons substitué au génome Lac^+ soit la délétion X74 (par croisement avec Hfr 3000 X74) soit le génome $i^S{}_{43}z^+y^+$ (par intégration de ce génome introduit sous la forme d'un épisome $i^S{}_{43}z^+y^+$ suivie de l'élimination de cet épisome par traitement à l'acridine orange).
$i^S{}_{43}$ su^-	$(i^Sz^+y^+)$	dérivées de la souche FS26-19 (Lac^+ su^-) de Garen dans laquelle nous avons substitué au génome Lac^+ soit la délétion X74 (par croisement avec Hfr 3000 X74) soit le génome $i^S{}_{43}z^+y^+$ (par intégration de ce génome introduit sous la forme d'un épisome $i^S{}_{43}z^+y^+$ suivie de l'élimination de cet épisome par traitement à l'acridine orange).

Voir dans le texte l'origine des épisome i^- utilisés.

le taux de 6 unités environ caractéristique d'une souche i^+/Fi^+. Ceci doit, vraisemblablement, être interprété sur la base de la présence d'une moyenne de 2 épisomes par cellule et de la multiplication du nombre des opérateurs o^+ par rapport au nombre des gènes i^+ produisant un répresseur actif. Dans le cas de chacun de ces diploïdes trois gènes opérateurs o^+ doivent être bloqués par le produit d'un seul (i^+/Fi^-_3), deux (i^-_3/Fi^+) ou trois (i^+/Fi^+) gènes i^+. Il semble donc que la quantité de répresseur produite par un seul gène i^+ ne soit pas suffisante pour saturer plusieurs opérateurs, ce qui soutient l'hypothèse, vérifiée pour le répresseur du bactériophage λ (36, 37), selon laquelle le nombre de molécules de répresseur présentes par bactérie est petit. Le gène muté i^s_{43} affecte, tout autant que le gène i^+, la synthèse constitutive dirigée par les trois allèles i^- analysés mais, contrairement au gène i^+, en rendant les diploïdes i^s_{43}/i^- non inductibles par l'IPTG 10^{-4}M, propriété caractéristique du génome i^s_{43} qui manifeste ainsi sa dominance.

Remarquons encore une fois que l'ensemble des propriétés de diploïdes i^s/Fi^- peut s'expliquer également par la formation d'un répresseur hybride de type $n(R^sR^-)$ dont les affinités pour l'opérateur d'une part et pour l'inducteur d'autre part sont intermédiaires entre celles des répresseurs de types n (K^s_2) et n (R^-_2).

Nous nous sommes attachés ensuite à montrer que cet ensemble de propriétés d'induction des i^s reflétait des conséquences de mutations affectant le gène régulateur i, le premier candidat à éliminer comme siège de ces mutations étant le gène z. On sait, en effet, que la β-galactosidase est essentielle à la transformation du lactose, et peut-être d'autres sucres, en inducteur de l'opéron Lac (38). On peut donc imaginer certaines mutations dans le gène de structure z donnant lieu à une β-galactosidase dont l'activité serait modifiée de façon à produire, à partir du lactose par exemple, des sucres qui seraient non pas inducteurs, mais plutôt des inhibiteurs d'induction (39, 40). De telles mutations de z seraient dominantes par rapport à l'allèle sauvage z^+ dans une souche diploïde portant à la fois la mutation postulée et un épisome de type sauvage $i^+z^+y^+a^+$. Cette hypothèse semble éliminée dès l'abord du fait que le niveau de base d'activité de β-galactosidase atteint en absence d'inducteur est identique chez ces mutants au niveau de base atteint chez les souches de type sauvage. Pour autant que l'on interprète ce niveau de base comme la conséquence d'une dérépression partielle, il devrait, en effet, être sensible à des in-

hibiteurs d'induction. En outre, nous montrerons que la β-galactosidase induite par l'IPTG chez ces mutants ne peut se distinguer de la β-galactosidase de type sauvage quant à son fonctionnement in vivo et à la nature des produits formés in vitro par son action sur le lactose.

Enfin, le mode de réversion des mutants i^s au phénotype Lac^+ et le comportement de diploïdes $i^s i^-/Fi^+Z^o$ excluent la possibilité qu'ils résultent de mutations affectant le gène z (voir page 64). Les caractéristiques de l'effet glucose sur l'induction des mutants i^s et leur localisation dans la région Lac rend, d'autre part, improbable l'hypothèse selon laquelle ils seraient le résultat de mutations, indépendantes du produit du gène i, augmentant leur sensibilité à la répression calabolique telle qu'elle a été étudiée notamment par Loomis et Magasanik (41) (voir page 52). L'ensemble de leur propriétés décrit ci-dessous suggère au contraire, qu'ils sont le produit de diverses mutations du gène i affectant l'affinité du répresseur pour les inducteurs de l'opéron Lac.

Propriétés de la β-galactosidase induite chez certains mutants i^s

Les expériences décrites dans ce paragraphe tendent à éliminer l'hypothèse citée précédemment - selon laquelle les mutations de type i^s affecteraient le gène z, donnant lieu à une β-galactosidase aux propriétés modifiées. Nous montrons ici que la β-galactosidase induite par l'IPTG chez les mutants i^s2A, 14A et 16Z est normale dans le sens qu'elle fonctionne in vivo et permet la croissance de ces mutants en milieu contenant du lactose comme seule source de carbone. La β-galactosidase induite chez ces mutants i^s ne peut pas non plus être distinguée de la β-galactosidase induite chez des organismes de type sauvage quant aux produits de leur action sur le lactose in vitro.

a) Activité in vivo

La souche 2000m14A a été cultivée en milieu minimum 63 contenant du glycérol comme seule source de carbone et additionné d'IPTG 10^{-4}M. Les bactéries sont récoltées par centrifugation pendant la phase exponentielle de croissance et inoculées dans du milieu minimum 63 contenant comme seule source de carbone soit -

- glycérol 2×10^{-2}M
- lactose 10^{-3}M
- lactose 10^{-2}M

La croissance de ces trois cultures est suivie par mesure de densité optique et des échantillons sont prélevés à des intervalles de 30 minutes en vue de doser l'activité de la β-galactosidase.

La figure I, page 43, rend compte des résultats obtenus. On voit que ces bactéries i^s ainsi préinduites sont capables d'utiliser le lactose comme source de carbone pour leur croissance. Leur β-galactosidase est donc fonctionnelle in vivo, mais l'activité de cette enzyme par ml de culture reste parfaitement constante tout au cours de la croissance en lactose. En d'autres termes, l'activité spécifique de la β-galactosidase est diluée par l'augmentation de masse bactérienne et ceci de façon identique dans les 3 cultures. Le lactose ne peut donc induire le mutant $i^s_{14}A$ mlagré la présence d'une β-galactosidase dont l'activité doit permettre la transformation de ce β-galactoside en sucres inducteurs du type sauvage i^+, décrits par Burstein et al. (42). Remarquons que l'on n'observe pas même une synthèse momentanée de cette enzyme à la faveur de l'épuisement du lactose 10^{-3}M, ce qui serait le cas si l'incapacité d'induire du lactose était due à sa transformation en sucres inhibiteurs d'induction. Ce point sera repris et confirmé plus loin (page 47).

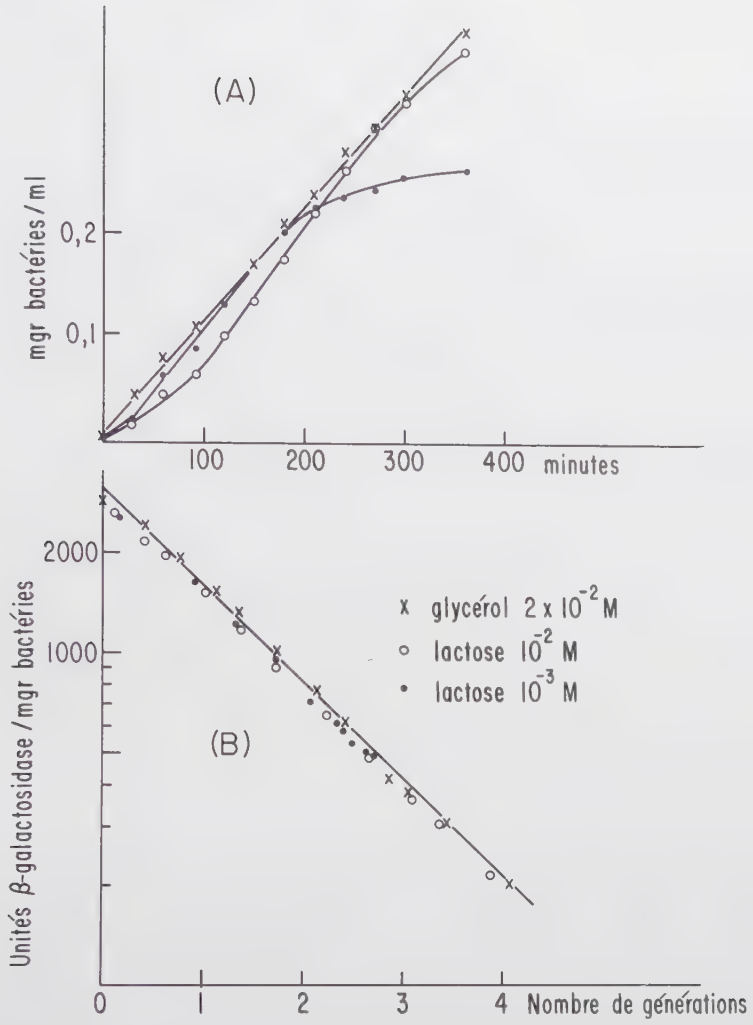
b) Action in vitro sur le lactose

Nous avons cultivé en milieu minimum 63 contenant du glycérol comme source de carbone et de l'IPTG 10^{-3}M les souches suivantes:

2000m 2A/F2A)
2000m14A/F14A) $i^s z^+ y^+$
2000m16Z/F16Z)
2000m18/F18 (souche témoin $i^+ z^+ y^-$)
2000m/FLac$^+$ (souche témoin $i^+ z^+ y^+$)

Les bactéries, récoltées par centrifugation, sont lavées au milieu 63 et remises en suspension dans un tampon aux phosphates de potassium 0.1M pH 7,5. Ces suspensions sont soumises à l'action des ultra-sons d'un générateur Mullard pendant 1 minute. Les extraits ainsi obtenus sont clarifiés par 10 minutes de centrifugation à 20.000 g, et leur activité de β-galactosidase est mesurée. Ils sont dilués au tampon aux phosphates de façon à ajuster leur activité de β-galactosidase par ml d'extrait à la même valeur, telle que 0,1 ml de chaque extrait hydrolyse en 30 minutes 73 µM de lactose, soit la moitié du lactose pré-

FIGURE I



Activité in vivo de la β-galactosidase induite chez la souche 2000m i^{s}_{14A}

Graphique A: Cinétiques de croissance de bactéries récoltées en croissance exponentielle en milieu 63 au glycérol + IPTG 10^{-4}M lors de leur transfert en milieu 63 sans inducteur contenant comme seule source de carbone

X glycérol 2.10^{-2}M
O lactose 10^{-2}M
. lactose 10^{-3}M

Graphique B: Dilution de l'activité spécifique de β-galactosidase mesurée au cours des croissances ci-dessus.

sent dans les conditions d'incubation suivantes à 40°C:

(2 ml de lactose 5% (146 µM/ml)
($MnSo_4$ 10^{-4}M
($MgCl2$ 10^{-3}M
(0,2 ml extrait bactérien

Des échantillons sont prélevés avant incubation et après 15,30 et 60 minutes d'incubation. Leur activité enzymatique est détruite par traitement au bain-marie bouillant pendant 5 minutes. 10 µL de chaque échantillon sont déposés sur papier Whatman No. 1 et leur contenu en sucres réducteurs analysé par chromatographie tel qu'il est décrit au chapitre II.

Les résultats de ces chromatogrammes apparaissent en figure II, page 45.

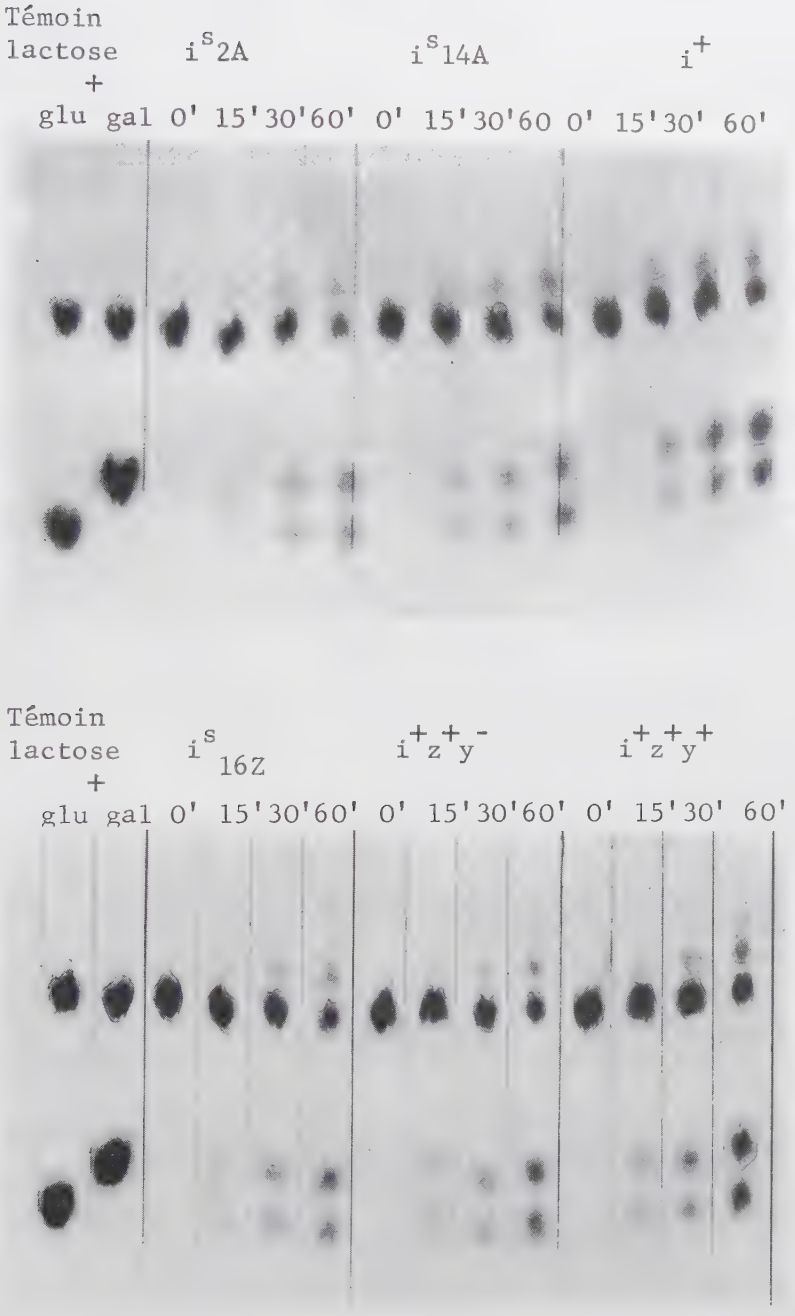
Dans tous les cas, l'action de la β-galactosidase donne lieu aux produits de l'hydrolyse du lactose (glucose et galactose) ainsi qu'à des produits de transgalactosidation, di et trisaccharides à vitesse de migration plus faible. Les produits formés par action de la β-galactosidase des mutants i^s ne peuvent, dans les conditions adoptées, se distinguer ni qualitativement ni quantitativement des produits formés par la β-galactosidase induite chez les bactéries de type sauvage i^+. Nous pouvons donc conclure que, dans les limites de sensibilité de notre analyse, la β-galactosidase induite chez les mutants i^s2A, 14A, et 16Z, manifeste la même activité enzymatique <u>in vitro</u> vis-à-vis du lactose que la β-galactosidase extraite de bactéries de type sauvage i^+ induites.

<u>Etude de l'absence d'induction par le lactose</u>

Burstein et al. (42) ont démontré que le lactose n'est pas un inducteur de l'opéron Lac, mais bien certains produits de l'action de transgalactosidation de la β-galactosidase sur le lactose en présence de divers alcools. Ces auteurs ont démontré, notamment le pouvoir inducteur de l'allolactose, du galactobiose, du glycérol-β-D-galactoside.

Sur la base de ces données on peut concevoir une hypothèse expliquant l'absence d'induction par le lactose chez les i^s par une mutation touchant le gène z, dominante sur l'allèle z^+ et produisant une β-galactosidase modifiée formant à partir du lactose un inhibiteur d'induction au détriment éventuel de la

FIGURE II



Analyse chromatographique des produits d'action in vitro sur le lactose de la β-galactosidase de mutants i^s et de type sauvage i^+

Détails dans le texte.

formation des inducteurs par transgalactosidation. Or, il semble que les produits formés par action de la β-galactosidase des i^s sur le lactose soient identiques à ceux formés par action de la β-galactosidase de type sauvage i^+ dans les mêmes conditions (voir figure II). Nous n'avons, toutefois, pas analysé chez les souches i^s les produits de transgalactosidation obtenus in vitro en présence de divers alcools par action de la β-galactosidase de type sauvage i^+ et dont le rôle inducteur nous fut révélé plus tard (42). Rappellons cependant que le glycérol-thio-galactoside, bon inducteur chez les bactéries de type sauvage, n'induit que faiblement les mutants i^s et uniquement les i^s inductibles par l'IPTG (tableau IV). Enfin, des conditions de carence lors d'une croissance en lactose ne provoquent pas non plus d'induction par ce sucre (voir page 47) ce qui semble écarter aussi l'hypothèse de la formation d'un inhibiteur d'induction à partir du lactose. On peut objecter toutefois à l'expérience portée en figure I qu'elle a été réalisée en absence de glycérol, c'est-à-dire dans des conditions où l'inducteur, glycérol-β-D-galactoside, ne pouvait être formé. Pour répondre à cette objection, nous avons repris des essais d'induction par de faibles concentrations de lactose en présence de glycérol cette fois, dont les résultats sont décrits ci-dessous.

Il est connu, d'autre part, que le glucose (43, 44) inhibe la synthèse des enzymes de l'opéron Lac, comme de beaucoup d'autres enzymes de E. coli par accumulation de produits intermédiaires du catabolisme cellulaire (45), phénomène connu sous le nom de "effet glucose" ou de "répression catabolique". Il convenait d'écarter aussi l'hypothèse selon laquelle le comportement des mutants i^s serait dû à leur sensibilité accrue à ce type d'inhibition. Dans ce but, nous avons étudié l'effet du glucose sur l'induction du mutant i^s_{14A}. Le rôle de la "répression catabolique" dans l'expression des mutants i^s a pu être écarté en montrant que leur comportement reste inchangé soit dans des conditions d'appauvrissement des réserves cellulaires soit dans une souche bactérienne libérée de la "répression catabolique" par mutation (46).

a) Essai d'induction à faible concentration en lactose en présence de glycérol.

Des cultures des souches 3000 (i^+) et 2000m14A en phase exponentielle de croissance en milieu minimum 63 au glycérol sont divisées chacune en 3 sous-cultures additionnées soit de -

- lactose 10^{-5}M
- lactose 10^{-4}M
- lactose 10^{-3}M

Leur croissance est suivie par mesure de densité optique et des échantillons sont prélevés après 20, 40, 60 et 120 minutes de contact avec le lactose. Les échantillons sont additionnés de chloramphénicol (1γ/mL) et conservés à 0^{o}, afin d'arrêter toute synthèse protéique, avant d'être analysés quant à leur activité de β-galactosidase.

Les résultats, portés en figure III, page 48, représentent l'augmentation de l'activité de β-galactosidase (en U/mgr de bactéries) en fonction de l'augmentation de masse bactérienne mesurée par la densité optique.

Dans les conditions adoptées, le lactose 10^{-4}M induit 5200 unités de β-galactosidase par mgr de bactéries de type sauvage i^{+} tandis qu'on ne peut déceler que environ 7 unités de β-galactosidase par mgr de bactéries i^{s}14A dont le niveau d'activité en absence d'inducteur est de 4 U/mgr de bactéries. Les faibles activitées décelées dans la souche i^{s}14A peuvent cependant être mesurées, comme en témoigne la figure III, avec une précision suffisante pour permettre d'exclure la possibilité qu'une synthèse d'enzyme même momentanée ou de l'ordre du double du niveau de base ait pu échapper à notre détection.

Cette expérience, en même temps que le faible pouvoir inducteur du glycérol thio-galactoside chez les i^{s} (tableau IV) suggère que l'incapacité du lactose d'induire les mutants i^{s} est due à ce que la concentration intracellulaire de glycérolgalactoside, suffisante pour induire les souches i^{+}, est insuffisante pour induire les souches i^{s}.

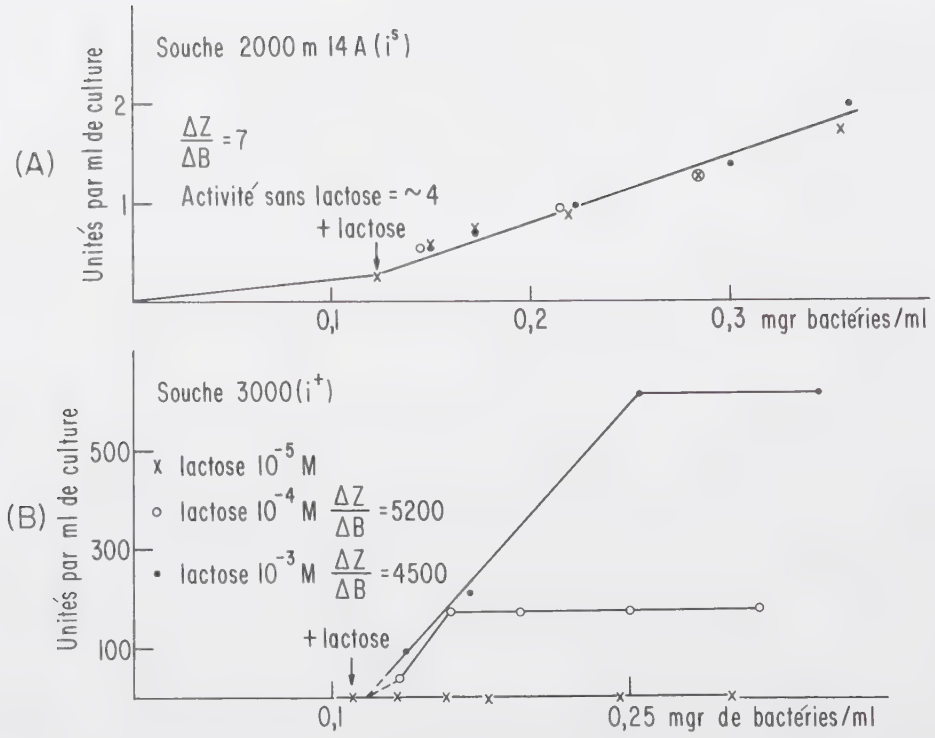
b) Essai d'induction de i^{s}_{14A} par le lactose à la faveur d'une diauxie en glucose + lactose.

Les souches C_{6000} et 2000m14A sont mises en croissance en milieu minimum 63 contenant du glucose 10^{-3}M comme seule source de carbone. Dès l'installation de la phase exponentielle de croissance chacune de ces cultures est divisée en deux parties auxquelles on ajoute soit lactose 5.10^{-4}M - soit IPTG 5.10^{-4}M. Les croissances sont suivies par mesure de densité optique tandis que des échantillons sont prélevés et traités immédiatement au mélange toluène-désoxycholate en vue de doser leur activité de β-galactosidase.

Les résultats sont représentés graphiquement en figure IV, page 49.

La croissance s'arrête dans toutes les cultures à cause de l'épuisement du

FIGURE III



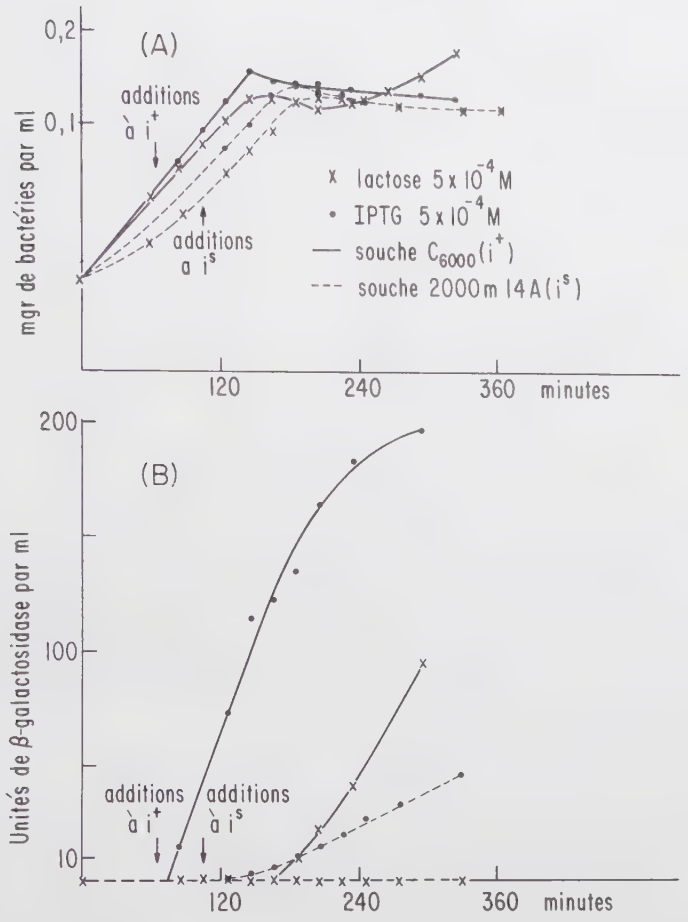
Induction de la β-galactosidase par le lactose en milieu minimum au glycérol chez une souche i^s et i^+

Graphique A: Variation de l'activité de β-galactosidase par ml de cultures de souche i^s en fonction de l'augmentation de masse bactérienne. Trois cultures identiques en milieu 63 au glycérol sont additionnées, au point indiqué par la flèche, de lactose aux concentrations suivants:

X lactose 10^{-5}M
O lactose 10^{-4}M
. lactose 10^{-3}M

Graphique B: Expérience réalisée chez une souche i^+ de manière identique à celle portée au graphique A. Remarquons que l'échelle portant les activités de β-galactosidase est d'un autre ordre de grandeur que celle utilisée au graphique A.

FIGURE IV



Induction de β-galactosidase chez une souche i^s ou i^+ au cours d'une diauxie en glucose + lactose.

Graphique A: Cinétiques de croissance en milieu 63 au glucose additionné au moment indiqué par la flêche, de

X lactose 5 10^{-4}M
. IPTG 5 10^{-4}M

Graphique B: Cinétique d'apparition de l'activité de β-galactosidase au cours des croissances ci-dessus.

glucose. Vingt minutes après cet arrêt, la souche i^+ contient déjà une quantité décelable de β-galactosidase, qui augmente jusqu'à permettre à cette souche d'utiliser le lactose comme source carbonée, ce qui se manifeste par une reprise de la croissance. Par contre, 180 minutes après l'épuisement du glucose par la souche i^s_{14A} il n'y a toujours aucune trace d'induction par le lactose. Chez ces deux souches l'induction par l'IPTG se manifeste avant épuisement du glucose, phénomène qui sera décrit quantitativement dans l'expérience suivante.

Il apparaît donc que, même dans des conditions ou le contenu cellulaire en catabolites est minimisé par carence en source de carbone, le lactose est incapable d'induire la souche i^s_{14A}.

c) Effet du glucose sur l'induction par l'IPTG de i^s_{14A}

Les souches $C_{6000}(i^+)$ et 2000m14A ont été cultivées en milieu minimum 63 contenant du glycérol comme source carbonée. Au cours de la phase exponentielle de croissance chaque culture est divisée en deux parties auxquelles on ajoute

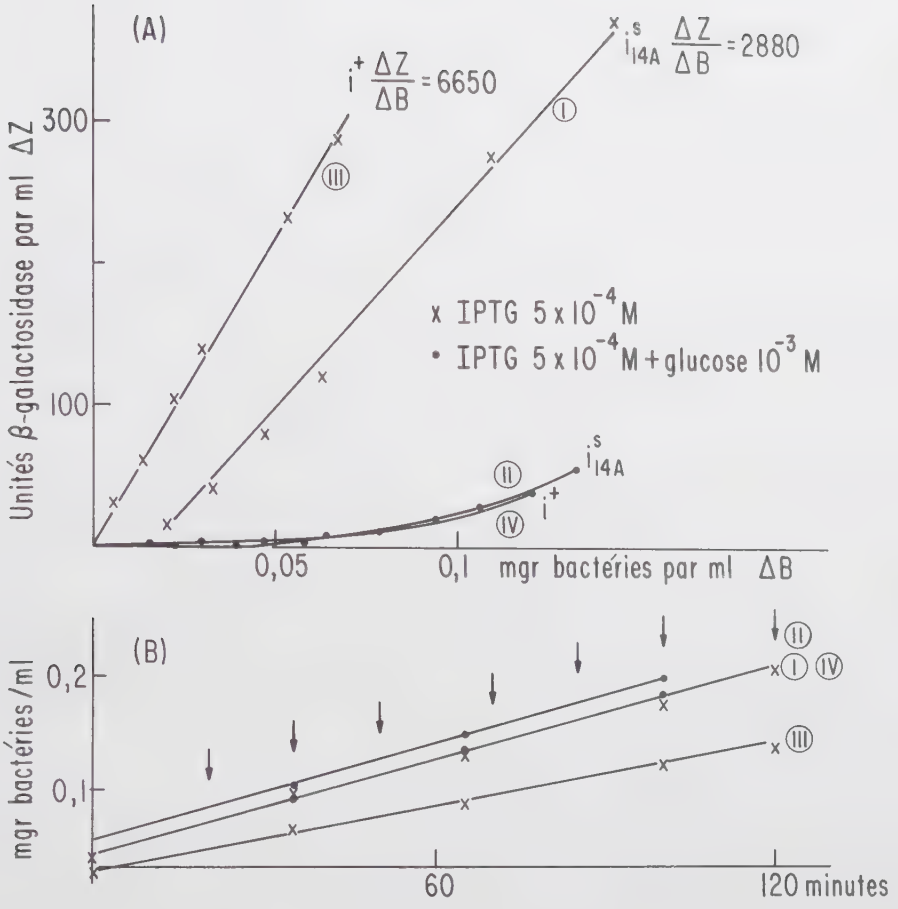
soit IPTG 5.10^{-4}M
soit IPTG 5.10^{-4}M + glucose 10^{-3}M.

Les croissances sont suivies par mesure de densité optique et des échantillons prélevés et traités immédiatement au mélange toluène et désoxycholate en vue de doser l'activité de β-galactosidase.

La figure V, page 51, présentant ces résultats, montre que les deux souches i^+ et i^s échappent simultanément à l'effet du glucose. En effet, le taux de synthèse de β-galactosidase augmente parallèlement dans ces deux souches et ceci à des concentrations en glucose qui doivent être très proches puisque leur croissance évolue de façon presque identique.

Nous pouvons donc conclure que, dans les limites de notre expérience,nous n'avons pas pu déceler une différence de sensibilité au glucose lors de l'induction par l'IPTG des souches i^+ et i^s_{14A}. Remarquons que, à la concentration 5.10^{-4}M d'IPTG utilisée, le taux différentiel de synthèse de β-galactosi-

FIGURE V



Effet du glucose sur l'induction par l'IPTG de souches i^s ou i^+

Les souches C_{6000} (i^+) et 2000m14A (i^s) cultivées en milieu minimum 63 au glycérol ont été additionnées au début de l'expérience de

X IPTG 5 10^{-4}M
. IPTG 5 10^{-4}M + glucose 10^{-3}M

Graphique A: Vitesse différentielle de synthèse de β-galactosidase. Les chiffres I, II, III, IV correspondent aux courbes de croissances portées au graphique B.

Graphique B: Cinétiques des croissance au cours desquelles, aux moments indiqués par les flèches, le prélèvement d'échantillons a permis d'établir le graphique A.

dase est environ deux fois plus élevé chez la souche i^+ que chez le mutant i^s. Cette concentration d'IPTG n'est, en effet, pas saturante pour le mutant i^s_{14A} comme nous le montrerons plus précisément en page 53.

d) Expression de la mutation i^s_{43} dans une souche "répression catabolique" négative.

La "répression catabolique" spécifique de l'opéron Lac est contrôlée par un gène mis en évidence par Loomis et Magasanik (46). Ces auteurs ont isolé, à partir de la souche 3000 de E. coli K_{12}, des mutants chez lesquels la synthèse des enzymes de l'opéron Lac est insensible simultanément à la répression par le glucose et par les catabolites dérivés de diverses sources carbonées. Ceci indique que l'effet glucose n'est qu'un cas particulier de "répression catabolique". Cette mutation touche spécifiquement l'expression de l'opéron Lac, la synthèse de trois autres enzymes analysées restant sensible à l'inhibition par le glucose. La mutation responsable de ce phénotype n'est pas liée à la région Lac; elle est proche du locus tryptophane et récessive sur l'allèle sauvage "répression catabolique" positive dans une bactérie diploïde pour la région considérée. Enfin, ces auteurs ont également montré (46) que la répression catabolique de l'opéron Lac est indépendante du produit du gène régulateur i de cet opéron. La question se pose donc de savoir si le comportement des mutants i^s n'est pas dû à une sensibilité accrue d'un élément de l'opéron Lac, autre que le gène i, au produit du gène contrôlant la répression catabolique de cet opéron. L'expérience décrite ci-dessous, écarte, croyons-nous, cette hypothèse. Elle a pu être réalisée dans la souche LA-12 "répression catabolique" négative reçue de Loomis et Magasanik que nous remercions vivement.

Un épisome de type $Fi^s_{43}z^+y^+$ a été transféré dans la souche LA-12 Lac^+ ($i^+z^+y^+$) et, à titre de contrôle, dans la souche FS26-19 Lac^+ ($i^+z^+y^+$) de type sauvage quant à la répression catabolique. Nous avons cultivé en milieu minimum 63 au glycérol les quatre souches:

LA-12	: $i^+z^+y^+$	) répression cata-
LA-12/Fi^s_{43}	: $i^+z^+y^+/Fi^sz^+y^+$	) bolique négative
FS26-19	: $i^+z^+y^+$	) répression cata-
FS26-19/Fi^s_{43}	: $i^+z^+y^+/Fi^sz^+y^+$	) bolique positive

Pendant la phase exponentielle de croissance ces cultures sont additionnées

soit d'IPTG 10^{-3}M

soit d'IPTG 10^{-3}M + glucose 10^{-2}M

Des échantillons sont prélevés 1 heure, 2 heures, et 3 heures plus tard, leur densité optique et leur activité de β-galactosidase ont été mesurées et portées en figure VI, page 54.

On voit que l'expression de l'épisome $Fi^{s}z^{+}y^{+}$ reste inchangée, qu'il soit hébergé dans une souche sensible ou non à la répression catabolique: dans les deux souches la mutation i^{s}_{43} se comporte comme étant non inductible par l'IPTG 10^{-3}M et partiellement dominante sur l'allèle i^{+} porté par le chromosome, tel qu'il a été décrit précédemment.

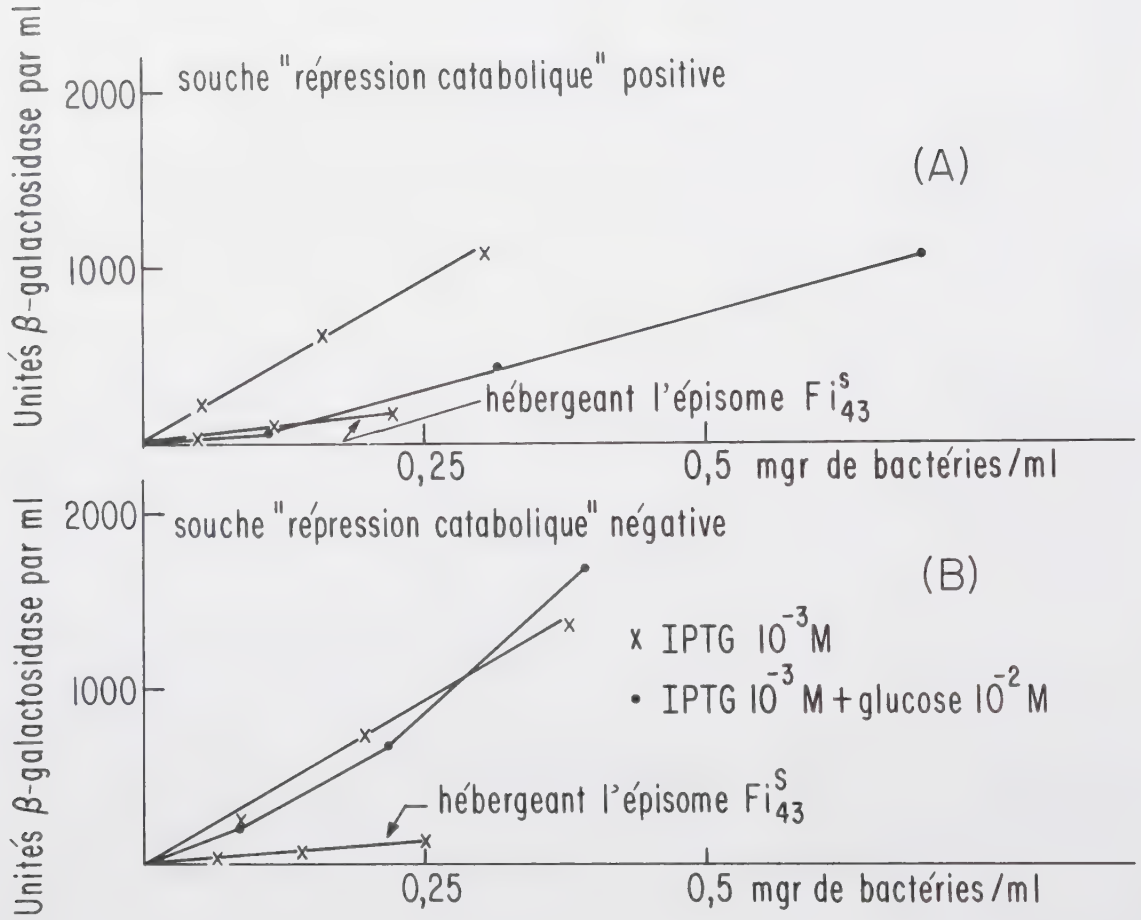
Rappellons que le gène de type sauvage "répression catabolique" positif est localisé loin de la région Lac et n'a donc pas pû être introduit dans la souche LA-12 par l'épisome Fi^{s}_{43}. Il semble donc que la mutation i^{s} ne touche pas l'opéron Lac en son site, différent du gène i, sensible au produit du gène contrôlant sa répression catabolique puisque en l'absence de ce produit (mutant LA-12) le phénotype i^{s} est conservé.

Caractéristiques de l'induction par l'IPTG du mutant i^{s}_{14A}

Dans l'étude des caractéristiques d'induction des différents mutants i^{s}, présentée au tableau IV, il est apparu que la plupart d'entre eux étaient encore inductibles par l'IPTG mais à des concentrations supérieures à cells induisant le type sauvage i^{+}. Le mutant i^{s}_{14A}, notamment, n'est pas induit au maximum, dans l'expérience représentée en figure V, par l'IPTG $5\text{-}10^{-4}$M, concentration assurant l'induction maximum de la souche $i^{+}C_{6000}$.

Il semble donc que la mutation i^{s} provoque une apparente diminution d'affinité du répresseur pour les différentes inducteurs, notamment pour l'IPTG. Ce phénomène a été étudié quantitativement chez le mutant i^{s}_{14A} dans l'expérience décrite ci-dessous. Il était particulièrement intéressant d'étudier la forme de la courbe d'induction en fonction de faibles concentrations en IPTG.

FIGURE VI



Expression de la mutation i$^{S}_{43}$ dans une souche "répression catabolique" négative

Graphique A: Vitesse différentielle de synthèse de β-galactosidase chez une souche i^{+} "répression catabolique" positive hébergeant ou non un épisome Fi$^{S}_{43}$ en croissance exponentielle en milieu minimum 63 au glycérol additionné de

X IPTG 10^{-3}M

. IPTG 10^{-3}M + glucose 10^{-2}M (souche haploïde seulement)

Graphique B: Expérience identique à celle portée au graphique A mais réalisée avec une souche "répression catabolique" négative.

En effet, comme nous l'avons exposé au Chapitre I, la forme de la courbe d'induction des souches i^+ en fonction de la concentration d'inducteur est sigmoïde indiquant, aux faibles concentrations, un effet coopératif des molécules d'inducteur caractéristique d'une interaction homotrope entre sites (I) d'une protéine allostérique. Cet effet homotrope est, selon le modèle présenté par Monod et al. (11), intimement lié à l'interaction hétérotrope (site I → site opérateur) qui serait responsable du phénomène d'induction. On attend donc qu'un changement d'effet hétérotrope soit éventuellement accompagné d'un changement d'effet homotrope. C'est ce point que nous avons essayé de vérifier ici en comparant la courbe d'induction d'une souche i^s_{14A} à celle du type sauvage i^+.

Il convient cependant d'insister sur certaines restrictions quant à l'interprétation de la mesure de ces effets dans le cas du répresseur. L'interaction I → O est, forcément, évaluée ici non par mesure de l'affinité de liaison des ligands mais, très indirectement, d'après le degré d'induction qu'elle entraîne. Quant à l'interaction I → I qui se manifeste dans ces conditions, son interprétation est, elle aussi, difficile du fait que, loin de travailler avec un système purifié, on utilise des bactéries entières.

Comparons toutefois les courbes, tracées en figure VII, page 56, représentant l'induction de β-galactosidase par l'IPTG de souches i^+ et i^s_{14A} toutes deux dépourvues de β-galactosides perméase.

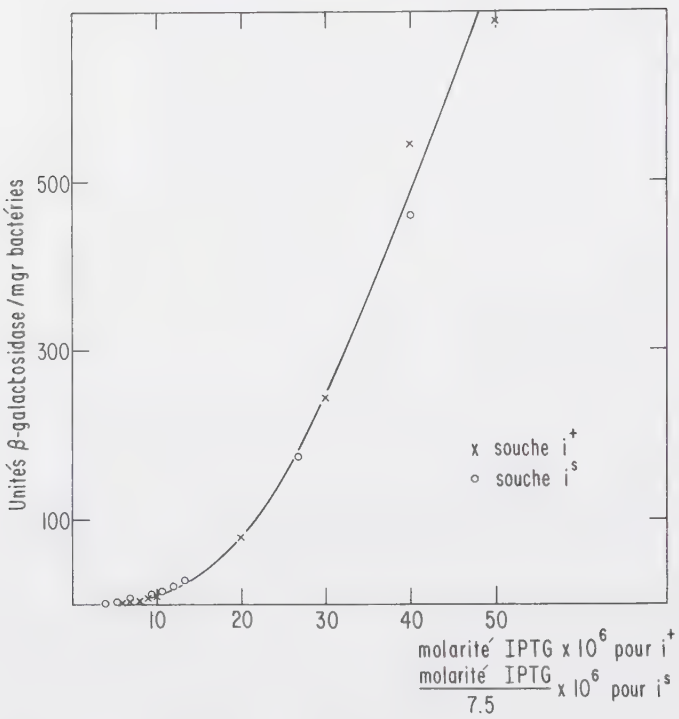
La mutation i^s se manifeste par un K_m apparent pour l'IPTG 7,5 fois plus élevé que chez la souche i^+, les valeurs des concentrations nécessaires à la moitié de l'induction maximum (V max = 5000 U/mgr) étant respectivement pour

$$i^+ \quad : \quad 9{,}5 \times 10^{-5} M$$
$$i^s \quad : \quad 7{,}1 \times 10^{-4} M$$

Comparons à présent la forme de ces deux courbes d'induction. Si l'on divise, comme nous l'avons fait, l'échelle des concentrations d'IPTG par 7.5 pour la souche i^s, les deux courbes se superposent, dans la limite des erreurs expérimentales. On observe dans les deux cas un effet homotrope coopératif pour la mesure duquel il est commode d'utiliser l'approximation de Hill qui, appliquée au cas présent, s'écrit:

$$\bar{v} = \frac{KI^n}{1 + KI^n} \quad (1) \quad \text{où}$$

FIGURE VII



Effet de la concentration d'IPTG sur l'induction de souches i^+ et i^s.

L'activité spécifique de β-galactosidase (en U/mgr de bactéries) a été mesurée dans des cultures en croissance exponentielle en milieu minimum 63 au glycérol additionné de différentes concentrations d'IPTG.

Remarquons que, en abcisse, l'échelle des concentrations d'IPTG est double, portant:

- pour la souche i^+ : molarité IPTG x 10^6
- pour la souche i^s : $\frac{\text{molarité IPTG}}{7,5} \times 10^6$

Les souches utilisées, dépourvues de β-galactoside perméase, sont:

- C_{600} : $i^+ z^+ y^- a^+$ (F. Jacob)
- 2000m14A-1 : $i^s_{14A} z^+ y^- a^+$

Le mutant $i^s_{14A} z^+ y^- a^+$ a été isolé à partir de la souche 2000m14A($i^s_{14A} z^+ y^+ a^+$) qui, après traitement au rayonnement ultra-violet, nous a fourni onze mutants indépendants manifestant le phénotype Lac$^-$ sur boîtes indicatrices EMB additionnées de lactose et d'IPTG 5.10^{-4}M, conditions où la souche $i^s_{14A} z^+ y^+ a^+$ est phénotypiquement Lac$^+$. Cinq de ces mutants se sont avérés à l'analyse être z^- et six être y^-. Chez le mutant 14A-1 ($i^s_{14A} z^+ y^- a^+$) utilisé ici l'IPTG 10^{-3}M induit la β-galactosidase tout comme chez la souche $i^s_{14A} z^+ y^+ a^+$, et induit 10% de l'activité de thio-galactoside transacétylase observée chez la souche mère sans provoquer d'apparition décelable d'activité de β-galactoside perméase. Ceci indique la présence d'une mutation y^- à effet polaire.

$\bar{v} = \frac{v}{Vmax}$, K est une constante et n un coefficient exprimant l'interaction entre sites identiques liant I et dont la limite est le nombre de ces sites c'est-à-dire, dans le cas d'une protéine allostérique, le nombre de protomères constituant cette protéine puisque le modèle attribue 1 site I par protomère.

La relation (1) peut aussi s'écrire:

$$\log \frac{\bar{v}}{1 - \bar{v}} = n \log I + \log K$$

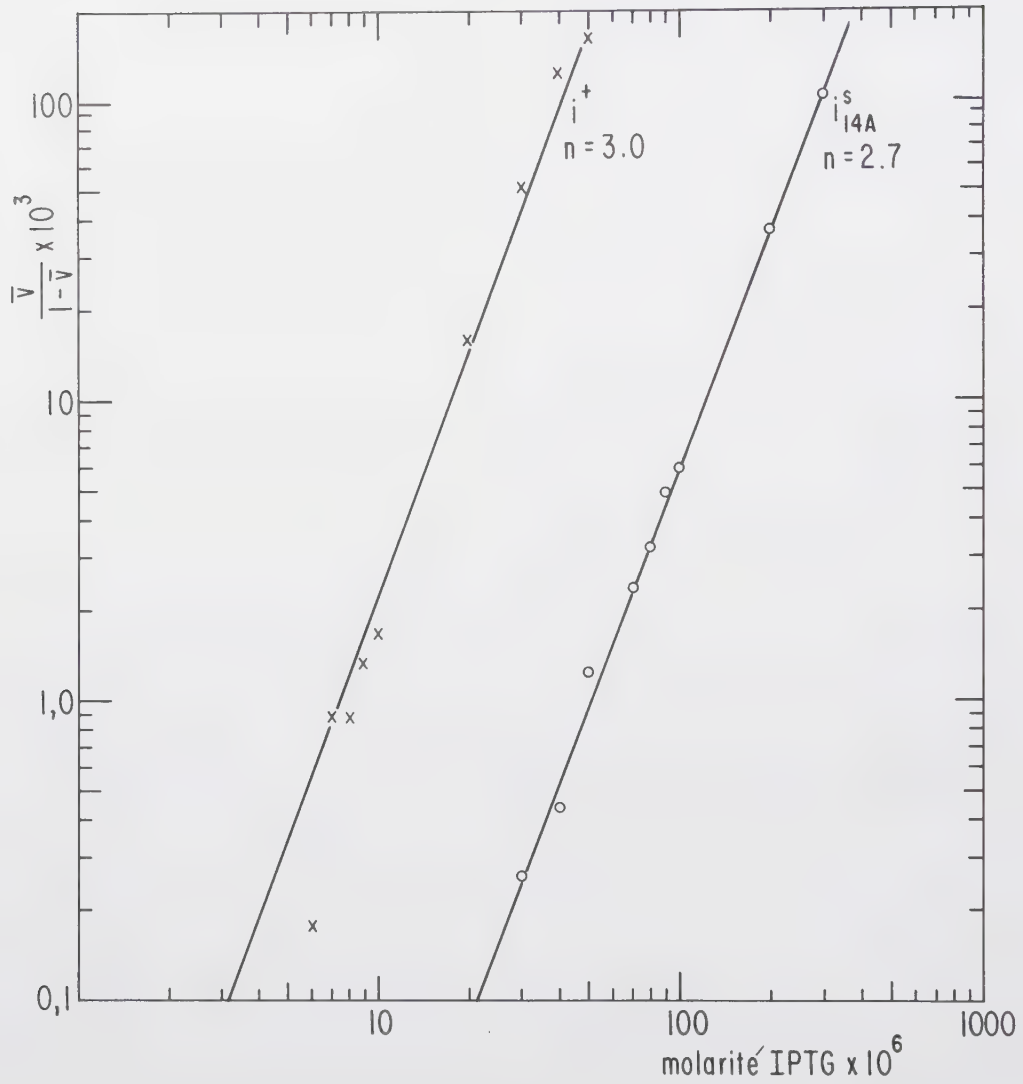
Les données expérimentales représentées en figure VII ont été portées en figure VIII, page 58, dans un système de coordonnées $\log \frac{\bar{v}}{1-\bar{v}}$: log I où elles donnent lieu à des droites dont les pentes déterminent les valeurs de n.

Ces valeurs sont: pour la souche i^+ n = 3,0
pour la souche i^s n = 2,7

En d'autres termes, l'effet homotrope coopératif de l'IPTG est, dans les limites de précision de nos mesures, pratiquement identique pour l'induction des souches i^+ et i^s_{14A} alors que les affinités apparentes de leur système d'induction respectif à l'égard de l'IPTG diffèrent d'un facteur de 7,5.

En termes du modèle allostérique, ce résultat signifie que la mutation i^s_{14A} a altéré la structure du répresseur de façon à diminuer son affinité absolue à l'égard de l'IPTG sans changer ni le nombre de ses promotères (supérieur à 3), ni l'affinité relative de ses formes R et T à l'égard de cet inducteur. Ce résultat est, essentiellement, négatif puisqu'il ne permet pas de mettre en évidence la relation étroite prévue par le modèle allostérique entre les interactions hétéro- et homotropes dont le répresseur serait le siège. Un résultat positif, montrant chez un mutant surréprimé un effet coopératif de l'IPTG différent de celui observé chez les bactéries de type sauvage, serait par contre une confirmation supplémentaire du modèle. Il est vraisemblable que le rapport de ces interactions varie d'un mutant i^s à l'autre et serait intéressant d'examiner d'autres i^s plus différents du type sauvage que l'i^s_{14A} quant à leurs caractéristiques d'induction. En outre l'influence de la température sur l'inductibilité des mutants i^s, mise en évidence précédemment et illustrée au tableau V, pourrait être exploitée et, en permettant l'induction de mutants i^s fortement surréprimés, aider à déceler certaines différences

FIGURE VIII



Coefficients de coopérativité de l'IPTG mesurés par induction des souches i^+ et i^s.

Les données d'induction de β-galactosidase portées en figure VII ont servi à calculer pour chaque concentration d'IPTG la valeur du rapport

$$\frac{\bar{v}}{1-\bar{v}} \quad \text{où} \quad \bar{v} = \frac{v}{Vmax} \quad \text{avec} \quad Vmax = 5000 \text{ U/mgr bact.}$$

Coefficients de coopérativité n = pentes des droites obtenues. (Voir détails dans le texte).

d'allure de courbes d'induction. De telles expériences impliquent l'emploi de souches y^- (et si possible thiogalactoside acétylase négatives) de préférence identiques à la souche i^+ sauf en ce qui concerne la mutation i^s. L'isolement de telles souches est, répétons-le, malaisé du fait du phénotype Lac^- des i^s fortement surréprimés. Enfin, l'interprétation de ces expériences ayant une valeur limitée par les restrictions mentionnées plus haut nous n'avons pas poursuivi cette approche dans le cadre du présent travail.

IV. Restauration du phénotype Lac^+ par mutation des i^s

Comme nous l'avons mentionné précédemment, tous les mutants i^s obtenus ont pu être incorporés dans un épisome FLac couvrant la région Lac et les segments d'ADN contigus sans s'étendre à aucun autre gène identifié du chromosome d'*E. coli*. Ceci localise approximativement les mutations i^s dans la région Lac. Nous décrirons dans ce paragraphe (exp. b) une expérience éliminant définitivement la possibilité qu'aucun des gènes de structure des enzymes "Lac" soit le siège des mutations i^s. Par ailleurs, Willson et al. (29) ayant obtenu les mutations $i^s y_{18}$ et 694 dans des souches Hfr ont réalisé une série de croisements leur permettant de situer ces mutations dans le gène i. La méthode d'isolement de mutants i^s que nous avons utilisée (voir page 20) nous les fournit, par contre, dans des souches F^- ou F'. Leur capacité de produire de doubles mutants de phénotype Lac^+, sélectionnés en même temps que les recombinants Lac^+, rend impossible l'analyse du produit de leur croisement avec une série d'Hfr Lac^- connus. Le même inconvénient s'est présenté au cours de nos essais de localisation de mutations i^s par transduction à l'aide du ϕ P_1. Le mode de réversion des i^s constitue, toutefois, un excellent argument en faveur de leur localisation dans le gène i; ce comportement sera analysé ci-dessous chez tous les mutants i^s et discuté. Une carte génétique des mutants du gène i, établie par croisements et sélection de recombinants i^+, reste la confirmation nécessaire de nos expériences indirectes. Elle donnerait également de précieuses informations sur la structure et le fonctionnement du répresseur, en dévoilant la nature mono- ou polycistronique de i et situant les régions de ce gène mises en jeu dans l'identification de l'opérateur et de l'inducteur respectivement. Une telle carte est, d'ailleurs, en voie de réalisation et des résultats préliminaires, communiqués par Julian Davies que nous tenons à remercier, confirment déjà la localisation de certains i^s.

a) Types de mutations restaurant le phénotype Lac^+

Willson et al. (29) ont démontré que, contrairement aux Lac^+ résultant de la réversion de mutants de gènes de structure, toutes les souches Lac^+ isolées à partir des i^sY18 et YA694 sont constitutives. Nous avons établi que ce comportement est caractéristique de tous les mutants i^s. Ceci est aisément interprété si l'on admet que les i^s produisent un répresseur anormal, R^s, dont la présence est responsable du phénotype Lac^- et qui peut être neutralisé par une mutation additionnelle inactivant R^s (i^-) ou rendant l'opérateur insensible à ce répresseur (o^c). Cette interprétation implique que la fréquence de réversion des i^s au phénotype Lac^+ doit être égale à la féquence d'apparition de mutants constitutifs i^- et o^c à partir d'une souche inductible i^+. La réversion d'i^s au génotype i^+, théoriquement possible, sera beaucoup plus rare parce qu'elle doit corriger avec précision la nature du répresseur plutôt que neutraliser son effet comme le fera n'importe quelle mutation de type i^- ou o^c. Aucune réversion au génotype i^+ n'a, en effet, été observée jusqu'à présent, tandis que l'expérience discutée ci-dessous montre que la fréquence d'apparition de mutants Lac^+ à partir d'i^s est, effectivement, du même ordre de grandeur que la fréquence de mutations d'une souche i^+ au type constitutif, à savoir $\sim 2 \times 10^{-7}$.

Dans une première expérience, 45 à 50 souches Lac^+ différentes dérivées de chaque i^s ont été prélevées sous la forme de papilles rouges apparaissant à la surface des colonies de souches i^s après incubation à 37^o pendant 48 à 72 heures de boîtes indicatrices MacConkey au lactose. Ces souches, réisolées deux fois, ont été ensuite analysées quant à leur capacité de synthèse de β-galactosidase en croissance en milieu 63 au glycérol sans inducteur. Toutes les souches ainsi obtenues (515 souches au total) étaient constitutives à divers degrés. Etant haploïdes et Sm^r, elles ont chacune reçu ensuite un épisome de type $Fi^s z^+ y^+ a^+$ portant, dans chaque cas, la même mutation i^s que celle dont elle provenait. Après étalement sur boîtes de milieu MacSm, afin d'éliminer la souche donatrice $Sm^s i^s/Fi^s$, celles-ci sont incubées pendant 15 heures à 37^o puis les colonies sont examinées afin de décider de leur génome i^- ou o^c. Les souches diploïdes obtenues sont Lac^- (segrégant des Lac^+) si la bactérie réceptrice était de type $i^s i^-$ tandis qu'elles sont Lac^+ si la souche réceptrice était de type $i^s o^c$. Les conclusions sont réunies dans la première partie du tableau X, page 61.

TABLEAU X

Souche Parente	Papilles Lac+ sur boîtes "Mac"							Technique "Fast Blue"						
	i^- Constitutivité de Z (U/mgr)			o^c Constitutivité de Z (U/mgr)			Nombre Total de Const. Analysés	i^- Const. de Z (U/mgr)			o^c Const. de Z (U/mgr)			Nombre Total de Const. Analysés
	<1500	>1500	Total	<1500	>1500	Total		<1500	>1500	Total	<1500	>1500	Total	
2000m2A	1	42	43			0	43							
2000m14A	0	47	47			0	47	3	4	7	1	1		8 $F = 1,9\ 10^{-7}$
2000m16Z	0	47	47			0	47							
2000mY18	1	47	48			0	48							
$C_{6000}44$	1	39	40	2	2	4	44							
$C_{6000}43$	6	22	28	19	0	19	47							
su^-43	0	48	48	2	0	2	50							
$X_{74}su^-/F'_{43}$	0	47	47	1	2	3	50							
$C_{6000}45$	1	26	27	20	0	20	47							
$C_{6000}N_1$	0	31	31	15	1	16	47							
$C_{600C}N_2$	5	20	25	20	0	20	45							
Zip 135							48							
$C_{6000}i^+$								2	3	5	1	1		6 $F = 1,4\ 10^{-7}$

Influence des techniques de sélectionnement sur la nature des mutants constitutifs obtenus à partir de souches i^s ou i^+.

Voir dans le texte les détails concernant d'une part les techniques de sélectionnement du mutants constitutifs et, d'autre part, la technique utilisée pour distinguer les mutants i^- des o^c. La souche Zip 135 étant F^+, nous n'avons pu y transférer un épisome Fi^s afin de décider du génome i^- ou o^c des dérivés Lac^+ obtenus. Le dosage de la β-galactosidase a révélé toutefois que tous les 48 dérivés Lac^+ obtenus sont constitutifs, 46 d'entre eux synthétisant environ 8000 U/mgr de Z, deux souches en synthétisant 500 U/mgr de bact.

Les résultats montrent que le rapport des souches $\frac{o^c}{i^-}$ varie de $\frac{\text{zéro } o^c}{\sim 46 \quad i^-}$ (souches 2000m dérivées de 2A, 14A, 16Z, Y18) à $\frac{20\ o^c}{25\ i^-}$ (souches C_{6000} dérivées de N_2). Ceci suggère que, dans les conditions utilisées, l'efficacité de déceler les dérivés o^c (synthétisant en général un niveau constitutif des enzymes "Lac" plus faible que les i^-) dépend de la nature de la souche utilisée (2000m ou C_{6000}) plutôt que de la nature de la mutation i^s considérée. Afin de vérifier ce point, nous avons essayé de répéter le résultat obtenu pour la souche $C_{6000}i^s{}_{43}$ ($\frac{19\ o^c}{28\ i^-}$) sur des souches d'origine différente de la souche C_{6000} mais portant également la mutation $i^s{}_{43}$. Les souches utilisées dans cette expérience témoin sont toutes deux dérivées de la souche F S 26 - 19 (Lac^+su^-) de Garen (voir tableau IX). L'une, $su^-{}_{43}$, porte la mutation $i^s{}_{43}$ dans le chromosome, l'autre, $X74su^-/F'_{43}$ porte la mutation $i^s{}_{43}$ dans l'épisome tandis que la région Lac du chromosome présente la délétion X74. Les résultats obtenus dans ce cas sont très différents de ceux obtenus chez $C_{6000}43$:

$$C_{6000}43 \quad : \frac{19\ o^c}{28\ i^-}$$

$$su^-43 \quad : \frac{2\ o^c}{48\ i^-}$$

$$X74su^-/F'43 \quad : \frac{3\ o^c}{47\ i^-}$$

Le mode de réversion de la même mutation $i^s{}_{43}$, analysé par prélèvement de papilles Lac^+, varie donc totalement selon que cette mutation est présente dans la souche C_{6000} ou dans une souche dérivée de FS26-19. Ceci met en évidence un artifice inhérent à cette technique. Les souches C_{6000} et FS26-19 donnent lieu à des colonies de formes très différentes sur boîtes Mac: la première forme de grandes colonies aplaties, la seconde des colonies plus petites et sphériques. Il semble que, d'après la forme des colonies, les papilles de bactéries constitutives à faible niveau de base (c'est-à-dire généralement o^c) apparaissent plus ou moins bien. De même, la taille des colonies de C_{6000} varie selon le nombre de colonies par boîtes et leur période d'incubation ce qui donne aussi, vraisemblablement, lieu à des variations dans la détection des papilles d'o^c.

Nous avons mis au point une nouvelle technique de coloration sélective de souches constitutives dont la sensibilité est telle que des souches synthétisant constitutivement 150 U/mgr de β-galactosidase (après croissance en milieu 63 au glycérol) se peuvent se distinguer de souches en synthétisant

5000 U/mgr. Cette technique a, en outre, l'avantage sur celle de prélèvement de papilles qu'elle est applicable aux souches i^+ aussi bien que i^s. Enfin, réalisée en absence de tout β-galactoside, elle convient également à mettre en évidence des mutants chez lesquels la synthèse constitutive des enzymes Lac serait réprimée par certains β-galactosides au cas où de telles souches existeraient. Remarquons que les techniques de sélectionnement de constitutifs en milieu liquide utilisées jusqu'à présent étaient toutes réalisées en présence d'un β-galactoside non inducteur et pauvre source de carbone, soit phényl β-d-galactoside soit néolactose: en conséquence on peut prévoir d'une part, que ces techniques favorisent le sélectionnement de constitutifs à niveau de base élevé (du fait que ces substrats ne permettent qu'une croissance lente des souches à faible niveau de Z) et d'autre part ne permettent pas l'isolement de mutants éventuels à synthèse constitutive inhibée par ces substrats. Une des conclusions tirée jusqu'à présent de ces anciennes techniques est, notamment, la fréquence beaucoup plus élevée de mutants i^- que d'o^c, mutants i^- qui, contrairement aux o^c, présentent un niveau de base élevé de Z, et que tous, i^- comme o^c, sont superinductibles. La méthode de coloration au "Fast Blue", décrite au Chapitre II, paraît plus objective et fut mise au point pour vérifier ces conclusions ainsi que pour pouvoir comparer la fréquence de réversion spontanée des i^s au taux de mutation au caractère constitutif des i^+ dans les mêmes conditions. Les résultats sont réunis dans la 2è partie du tableau X. Les fréquences obtenues sont:

pour i^+: $1{,}4\ 10^{-7}$
pour i^s: $1{,}9\ 10^{-7}$

c'est-à-dire du même ordre de grandeur, ce qui est en accord avec l'interprétation de la nature des mutations i^s proposée ci-dessus. Remarquons aussi que l'on a obtenu $\frac{1\ o^c}{7\ i^-}$ à partir de la souche C_{6000} (i^s_{14A}) qui avait donné lieu à $\frac{0\ o^c}{47\ i^-}$ par la technique de prélèvement de papilles, ce qui en confirme la faiblesse. Enfin il fut possible d'isoler des i^- à niveau de base faible (200 à 1,000 U/mgr), ce qui indique que le niveau constitutif élevé des i^- n'est pas une caractéristique inhérante à ces mutants. La technique au "Fast Blue" est longue si elle est appliquée à déceler des constitutifs apparus spontanément, c'est-à-dire peu fréquents. Le petit nombre de mutants ainsi isolés (8 à partir des i^s et 6 à partir des i^+ dont un o^c dans chaque cas) ne permet pas de reévaluer valablement le rapport $\frac{o^c}{i^-}$ obtenu spontanément. Cette tech-

nique, séduisante par son objectivité quant aux niveaux de base et par l'élimination de la présence de β-galactosides, semble particulièrement convenir à l'étude de l'influence de certains agents mutagènes sur la fréquence d'apparition de mutants i^- et o^c. Ce point, actuellement à l'étude, sera discuté au chapitre IV.

b) Analyse de diploïdes $i^s i^-/Fi^+ z^o$

En absence d'une analyse génétique permettant de localiser précisément les mutations i^s, une analyse fonctionnelle des mutants i^s et de leurs dérivés $i^s i^-$ permet d'examiner si les mutations i^s et i^- touchent le même cistron. L'analyse fonctionnelle des mutants $i^s o^c$, par contre, indique que les mutations i^s et o^c touchent deux cistrons différents.

En effet l'expression d'un grand nombre de mutations alléliques des gènes i et o a été observée dans des diploïdes. On connaît, notamment, le phénotype résultant des configurations suivantes, qui nous intéressent ici:

A: $\frac{i^s \quad i^-}{+ \quad +}$: inductible

B: $\frac{i^s \quad +}{+ \quad i^-}$: surréprimé

C: $\frac{i^s \quad o^c}{+ \quad +}$: constitutif partiel pauvrement inductible

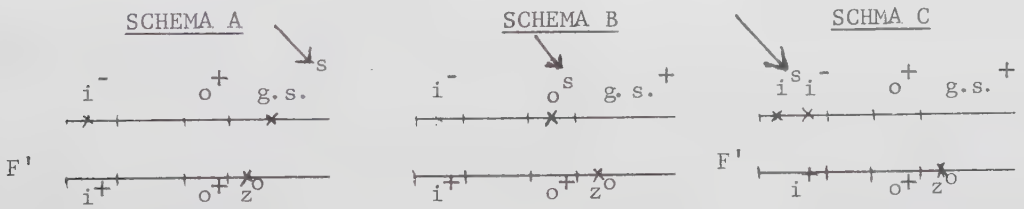
D: $\frac{i^s \quad +}{+ \quad o^c}$: constitutif partiel pauvrement inductible

Comparons les configurations représentées en A et B: tous les doubles mutants $i^s i^-$ examinés jusqu'à présent ont un phénotype constitutif récessif sur l'allèle sauvage i^+ (cas A). On sait, par contre, qu'un mutant i^s est dominant sur l'allèle i^- (cas B). Si une même paire de mutations i^s et i^- était analysée dans les configurations A et B, ceci constituerait une épreuve "cis-trans" démontrant formellement que i^s et i^- sont deux mutations d'un même cistron puisqu'elles ne se complémentent pas. Cette absence de complémentation entre mutations i^s et i^- sera largement illustrée et discutée aux chapitres IV et V. Malheureusement on n'a pas pu, jusqu'à présent, dissocier les deux mutations d'un double mutant $i^s i^-$ afin d'en étudier l'expression dans la configuration trans. Vu le grand nombre de mutants $i^s i^-$, i^s et i^- analysés on

peut prédire, cependant, que toutes les mutations i^s et i^- donneraient lieu à ce résultat si on les soumettait à l'épreuve "cis-trans" proprement dite.

Par contre, dans les cas représentés en C et D, tous les doubles mutants $i^s o^c$ examinés ont donné lieu en présence des allèles $i^+ o^+$ à un phénotype constitutif partiel pauvrement inductible (cas C) identique, cette fois, au phénotype (cas D) d'un diploïde portant des mutations i^s et o^c en configuration trans. Encore une fois, ceci ne constitue par une véritable épreuve cis-trans puisqu'elle n'a pu être réalisée avec une seule paire de mutations i^s et o^c analysée dans les deux configurations. Le grand nombre de mutants $i^s o^c$, i^s et o^c analysés donne cependant à cette étude la valeur d'une épreuve cis-trans dont on peut conclure que i^s et o^c sont deux mutations affectant des cistrons différents.

Nous avons analysé ici quantitativement le comportement de doubles mutants de type $i^s i^-$ en présence d'un épisome $i^+ z^o$ et confirmé que les mutations i^s affectent le gène i, en excluant les gènes de structure et l'opérateur de l'opéron Lac comme sites possibles des mutations i^s. En effet, l'épisome $i^+ z^o$ utilisé porte une mutation (z^o) de type "ochre" (47, 48) qui, localisée à l'extrémité du gène z proximale du gène i^+, laisse le gène i^+ intact, mais, par sa polarité, réduit au silence l'ensemble des gènes de structure de l'opéron Lac. En conséquence, selon que les mutations surréprimées soient localisées dans le gène i, dans l'opérateur ou dans l'un des gènes de structure de l'opéron Lac on attend un phénotype totalement différent des organismes diploïdes représentés dans les schémas suivants:



Dans l'hypothèse représentée en A, le phénotype d'un dérivé i^- de mutant surréprimé redeviendra i^s en présence d'un épisome $i^+ z^o$ du fait de la dominance du gène de structure surréprimé ($g.s.^s$) sur l'allèle soumis à l'effet polaire de la mutation z^o et de la présence de l'allèle i^+. Le schéma B représente la possibilité qu'une mutation i^s affecte l'opérateur (o^s), situation qui s'exprimerait également par le phénotype i^s d'un dérivé $i^- o^s$ hébergeant un épisome

$i^+o^+z^o$, du fait de la dominance de l'allèle o^s sur o^+ et de i^+ sur i^-.

Dans l'hypothèse présentée en C, au contraire, l'introduction d'un épisome i^+z^o dans un dérivé i^- de mutant i^s restaurera les propriétés d'induction du diploïde obtenu, le gène i^+ étant dominant sur le génome i^- et les gènes de structure ainsi que l'opérateur du mutant i^s étant de type sauvage. Les expériences décrites plus loin prouvent qu'il en est bien ainsi.

Des souches Lac^+ dérivées de chacun des mutants i^s haploïdes ont été obtenues sous forme de papilles rouges apparaissant sur les colonies de bactéries i^s après 3 jours d'incubation à 37^o de boîtes Mac au lactose.

Les souches de type o^c sont écartées par une analyse qualitative de leur dominance en présence d'un épisome $Fi_{43}{}^s z^+y^+$. Une souche Lac^+, récessive en présence d'un $Fi_{43}{}^s z^+y^+$ et synthétisant un niveau de base élevé de β-galactosidase en absence d'inducteur est retenue dans chaque cas pour l'analyse.

L'épisome Fi^+z^o a été obtenu par intégration dans un épisome $FLac^+$ du génome Lac porté par la souche 2000 U 118m. Cette souche isolée par Jacob et al. (2) porte une mutation polaire, localisée à l'extrémité du gène z proche de l'opérateur et suppressible par le gène su_c^+ suppresseur de mutations provoquant la terminaison de synthèse de chaînes polypeptidiques (48, 49). La présence du gène i^+ dans l'épisome F_{118} obtenu a été vérifiée par sa dominance sur le gène i_3^- (2) porté par la souche constitutive connue 2300 ($i_s{}^-z^+y^+$).

L'épisome F118 a été transféré dans une souche i^- dérivée de chacun des mutants i^s. Les diploïdes i^si^-/F_{118} ont été cultivés en milieu minimum Tris au succinate additionné de lactose 5.10^{-3}M ou d'IPTG 10^{-3}M. Leur activité spécifique de β-galactosidase a été mesurée et les résultats réunis au tableau XI, page 67.

Dans tous les cas les diploïdes i^si^-/Fi^+z^o obtenus sont inductibles par le lactose et par l'IPTG ainsi qu'il est prédit par l'hypothèse C présentée ci-dessus. Ces résultats excluent donc la possibilité que les mutations i^s soient localisés dans l'opérateur ou dans l'un des gènes de structure de l'opéron Lac et renforcent les arguments en faveur de leur localisation dans le gène i.

TABLEAU XI

mutations i^s	$i^s i^-$ sans inducteur	$i^s i^-/Fi^+z^o$ sans inducteur	+ lactose 5×10^{-3}M	+IPTG 10^{-3}M
2A	3460	23	4110	3800
16Z	3640	18	1960	-
14A	7450	38	4480	5540
44	7500	32	2040	-
43	3060	52	1540	4180
Y18	7800	7	1290	5330
45	4300	24	3810	5370
N_1	2510	17	2520	7810
N_2	3830	31	1830	4970

Induction de mutants $i^s i^-$ en présence d'un épisome i^+z^o

Les activités spécifiques de β-galactosidase sont exprimées en Unités par mgr de bactéries. Voir détails dans le texte.

V. Conclusions et discussion du Chapitre III

Les données réunies au chapitre III, en éliminant la possibilité que les mutations i^S touchent soit l'opérateur de l'opéron Lac soit l'un de ses gènes de structure z, y ou a, constituent un faisceau d'arguments qui, à défaut d'une localisation génétique précise, désignent néanmoins le gène i comme lieu des mutations i^S comme des mutations i^-. Le fait que l'action des répresseurs R^S soit abolie par des mutations i^- implique que les mutations i^S et i^- affectent le même gène. Ceci sera confirmé plus loin par la restauration du phénotype i^S par suppression d'$i^S i^-$ (chapitre IV) et par complémentation (chapitre V) entre gènes $i^S i^-$ et i^+. Les mutations i^S, uniques jusqu'à présent au système Lac, fournissent sur la nature du produit de i une précision que les mutations i^- n'ont encore pu apporter. Les i^S, en effet, contrairement aux i^-, conservent un répresseur actif, différant toutefois du produit de gènes i^+ par sa réponse à l'égard des inducteurs. L'ensemble des propriétés des i^S, en accord avec de nombreuses observations antérieures citées dans l'introduction de ce travail, est compatible avec le modèle attribuant au gène i la synthèse d'un répresseur, R, protéine allostérique siège d'interactions entre ses deux sites O et I. L'état surréprimé des i^S est alors explicable par une altération de la structure de R entraînant un changement d'affinité pour tous les inducteurs qui réagissent donc comme des ligands analogues du site I. Cette altération ne semble pas entraîner de thermolabilité accrue du répresseur ni de changement des affinités relatives de ses états R et T pour l'IPTG. Elle peut résulter d'une modification de la structure de R soit directement au niveau du site I soit dans une autre région de la molécule, n'intéressant pas le site O, et résultant indirectement en un changement d'affinité de I. Une autre interprétation des mutations i^S, compatible avec le modèle proposé, serait que ces mutants produisent un répresseur normal, mais en quantité plus élevée que les souches i^+, et dont l'inactivation nécessiterait une concentration plus forte d'inducteur. Il est vrai que, si l'on considère que le niveau de synthèse d'enzymes en absence d'inducteurs reflète la concentration intracellulaire de répresseur, les i^S ne semblent pas produire plus de répresseur que les i^+ puisqu'ils manifestent le même niveau de base d'enzymes que les bactéries de type sauvage. Les expériences de Hanawalt et Wax (50) suggèrent toutefois que la quantité d'enzymes synthétisée en absence d'inducteur est régie par la duplication de l'ADN et ne constitue donc pas une mesure de la concentration en répresseur. Le comportement du gène i^S_{43}, incapable comme le gène i^+ de bloquer

entièrement plusieurs opérateurs o^+ dans un diploïde $i^s_{43}o^+/Fi^-o^+$, pourrait indiquer que l'i^s_{43} synthétise un répresseur muté R^s plutôt qu'une quantité élevée de répresseur R^+. Toutefois cette expérience devrait être réalisée pour tous les mutants i^s, notamment les i^s les plus fortement surréprimés, avant d'écarter définitivement l'hypothèse que les i^s seraient hyperproducteurs de répresseur. Une telle souche, soit de type i^s, soit résultant d'une délétion soumettant i^+ au contrôle d'un autre opéron, pourrait être très utile à des essais d'isolement du répresseur.

L'interprétation des mutations i^s sur la base du modèle de Jacob et Monod est actuellement la plus simple. Rappellons, comme nous l'avons souligné dans l'introduction de ce travail, que d'autres modèles peuvent également rendre compte de l'ensemble des données d'induction de l'opéron "Lac" et du comportement des mutants i^s en particulier. La valeur de ces interprétations sera discutée au chapitre VI, après l'exposé de nos données de suppression de mutations i^- et de complémentation entre allèles du gène i.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA SUPPRESSION DE MUTATIONS i^- et o^c

I. Introduction

Nous avons mis à profit le phénomène de suppression génétique de mutations du gène i pour démontrer la nature protéique du produit de ce gène, c'est-à-dire du répresseur. Comme nous l'avons exposé dans l'introduction de ce travail, les indices de la nature protéique de R receuillis jusqu'à présent ne sont que très indirects. Comme nous le verrons ci-dessous, le phénomène de suppression génétique par certains gènes suppresseurs connus est susceptible, au contraire, d'apporter une preuve définitive de ce que le gène i détermine la structure d'une protéine. Cette étude est d'autant plus intéressante à réaliser dans le cas du gène régulateur, i, de l'opéron Lac qu'elle représenterait la première preuve de cette nature apportée pour un gène régulateur dont des allèles surréprimés, i^s, sont connus c'est-à-dire dont le rôle direct dans la synthèse de R s'est trouvé confirmé. Rappellons que dans le cas de la phosphatase alcaline, Garen et Garen (72) ont démontré la suppression de mutations constitutives localisées dans les gènes régulateurs, R_1 et R_2, de l'opéron correspondant. Il s'est avéré, cependant, que ces gènes ne peuvent déterminer directement la structure d'un répresseur (73, 74) et n'ont qu'un rôle indirect dans la régulation de synthèse de la phosphatase alcaline, mode de régulation d'ailleurs différent et plus complexe que celui régissant l'opéron Lac. Enfin, la suppression de certain allèles du gène régulateur du phage λ (75) constitue, jusqu'à présent, le seul cas où ce phénomène peut être interprété comme reflétant la nature protéique du répresseur correspondant. Il était donc important de réaliser le même type d'expérience dans le cas d'un opéron bactérien et, spécialement, de l'opéron Lac où nous avons pu confirmer, par notre étude d'une famille de mutants i^s, le rôle direct du gène i dans la synthèse de R.

Rappellons rapidement le principe des expériences de suppression génétique. Les gènes suppresseurs sont définis par le pouvoir d'un de leurs allèles (su^+) de réverser phénotypiquement l'effet de mutations présentes dans d'autres gènes. Récemment fut élucidé le mode d'action de gènes suppresseurs d'Escherichia coli supprimant la classe des mutations "amber" ou "ochre" observées dans divers gènes de bactéries et de bactériophages, notamment chez le bacteriophage T_4 (51, 52), lambda (53) et f_2 (54) ainsi que dans le gène de structure de la phospha-

tase alcaline (55) et celui de la β-galactosidase (47) de E. coli. Sarabhai et al. (49) ont démontré que les mutants amber du gène de structure déterminant la protéine de tête du phage T_4 produisent des fragments de cette protéine se terminant au point correspondant au site de la mutation. Les mutations amber et ochre agissent au niveau de la traduction de l'ARNm en protéine (56) parce qu'elles provoquent l'apparition dans le messager des triplets UAG et UAA respectivement (57). Ces triplets furent nommés triplets "non-sens" parce qu'ils ne peuvent normalement être traduits en un acide aminé et provoquent ainsi la terminaison prématurée des chaînes protéiques. Les gènes (su^+) suppresseurs de ces mutations agissent en déterminant la synthèse d'un ARN de transfert capable de traduire ces triplets en un acide aminé qui est inséré au point de la chaîne protéique affecté par la mutation et en prévient ainsi la terminaison prématurée (58, 59). Certaines données récentes indiquent également une modification des ribosomes résultant de la présence de gènes su^+ (60). En conséquence, le fait qu'une mutation soit sensible aux gènes suppresseurs d'amber ou ochre implique que cette mutation touche un gène traduit en protéine. C'est ce principe que nous avons appliqué pour démontrer que le gène régulateur i est traduit en un protéine qui doit donc constituer, en tout ou en partie, le répresseur R. Nous avons mis à profit les mutations i^s en travaillant avec des doubles mutants $i^s i^-$ (Lac^+ constitutifs) chez lesquels la suppression de la mutation i^- entraînera la restauration du phénotype i^s (Lac^- dominant).

II. Résultats

Isolement de mutants suppressibles

Les cinq souches originales utilisées sont Lac^+, toutes dérivées d'une même souche parente par Garen; quatre d'entre-elles portent chacune l'allèle su^+ de l'un des gènes suppresseurs, su_1^+, su_2^+, su_3^+ ou su_4^+, la cinquième portant l'allèle su^- de chacun de ces gènes suppresseurs. Ces souches, dont les propriétés sont réunies au tableau I, page 12, nous ont été données par A. Garen que nous remercions vivement. Elles seront désignées par les notations:

$Lac^+ su_1^+$)
$Lac^+ su_2^+$)
$Lac^+ su_3^+$) $F^- Sm^r T_6^s$
$Lac^+ su_4^+$)
$Lac^+ su^-$)

Les gènes su_1^+, su_2^+ et su_3^+ suppriment les mutations "amber" de la phosphatase alcaline permettant la traduction du triplet UAG en sérine, glutamine et tyrosine respectivement (61, 62). Le gène su_4^+ supprime les mutations ochre et, quoique avec moins d'efficacité que les précédents, les mutations amber, et traduit les triplets UAG et UAA en un acide aminé neutre non encore identifié (63). Les propriétés et la localisation génétique de ces suppresseurs suggèrent l'identité de ces gènes avec certains su^+ étudiés à l'aide de mutations du phage T_4 ou de la β-galactosidase de E. coli et, notamment, que:

su_1^+ correspondrait au su_I^+ décrit par Brenner & Beckwith (64)

su_2^+ " su_{II}^+ "

su_3^+ " su_{III}^+ "

su_4^+ " su_c^+ "

A partir des cinq souches précitées nous avons sélectionné une série de recombinants après croisements avec des souches Hfr convenables, ceci en prenant toujours soin de vérifier que chacun de ces recombinants avait conservé les caractéristiques de suppression de la souche F^- parente. Ceci fut réalisé dans chaque cas en déterminant leur sensibilité à une série de mutants amber ou ochre de phages T_4, aimablement donnés par R. S. Edgar que nous remercions vivement. Nous avons sélectionné notamment, après croisement avec la souche Hfr 3000 X74, les recombinants suivants présentant la délétion X74 couvrant la région Lac:

X_{74} su_1^+)
X_{74} su_2^+)
X_{74} su_3^+) $F^-Sm^rT_6{}^s$
X_{74} su_4^+)
X_{74} su^-)

Nous avons ensuite introduit dans la souche $X_{74}su^-$ un épisome portant le gène i^s_{43}, construisant ainsi la souche diploïde: $X_{74}su^-/Fi^s_{43}o^+z^+y^+a^+$. C'est à partir de cette souche que nous avons isolé, dans une première expérience, 1.100 souches différentes ayant réversé spontanément au phénotype Lac^+ et ob-

tenues sous forme de papilles Lac^+ apparues sur des colonies de $X_{74}su^-/Fi^s_{43}oz^+y^+a^+$ ayant crû sur boîtes indicatrices au lactose. Il nous fallut ensuite déterminer le génotype de ces 1.100 souches qui, comme nous l'avons montré précédemment (voir tableau X) peut être $X_{74}su^-/Fi^si^-$ ou $X_{74}su^-/Fi^so^c$. Ceci fut réalisé en transférant chacun de ces épisomes dans une souche $F^-i^s_{Y18}su^-T^r_6$ préparée à cet effet par croisement des souches Lac^+su^- et Hfr 3000 i^s_{Y18}. L'examen des diploïdes ($i^s_{Y18}su^-/F'i^s_{43}$ réversé à Lac^+) obtenus nous a permis de décider du caractère i^si^- ou i^so^c des mutations réversant le génotype i^s_{43}, identifiées, sur la base de cette analyse, comme 975 mutations i^si^- et 125 mutations i^so^c.

L'analyse de la suppression éventuelle de ces mutations i^- ou o^c fut effectuée par transfert des 1100 épisomes (Fi^si^- ou Fi^so^c) obtenus dans chacune des cinq souches Lac^+su^- ou $Lac^+su^+_{1, 2, 3, ou 4,}$ suivi de l'étalement de chacun des mélanges de souches donatrice et réceptrice sur boîtes de milieu TTZ au lactose. Remarquons que chaque souche donatrice ($X_{74}su^-/Fi^s_{43}i^-$ ou $Fi^s_{43}o^c$) est phénotypiquement Lac^+ et qu'il en est de même pour chaque souche F^- (Lac^+su^- ou Lac^+su^+) réceptrice d'épisome. La suppression de mutations i^- ou o^c, portées par des épisomes $F'i^si^-$ ou $F'i^so^c$, restaurera le phénotype i^s Lac^- dominant qui s'exprimera donc par l'apparition de colonies Lac^- (Lac^+su^+/Fi^si^- ou Fi^so^c) résultant du contact de deux souches Lac^+. Ceci est particulièrement aisé à déceler sur milieu TTZ au lactose qui donne lieu à des colonies blanches de bactéries Lac^+ tandis que les colonies de souches Lac^- sont d'un rouge violacé. La sensibilité du milieu TTZ s'est révélée telle que des colonies de souches de phénotype intermédiaire entre i^s et i^- (ou o^c), c'est-à-dire conservant une certaine activité constitutive de β-galactosidase, apparaissent d'une couleur rose plus ou moins intense. Cette qualité est indispensable à la mise en évidence de souches i^si^- ou i^so^c supprimées car on sait (65) que les suppresseurs utilisés ne restaurent pas à 100% l'effet des mutations "amber" ou "ochre": ceci est dû, tel qu'il a été démontré dans le cas de la phosphatase alcaline (65) tant à leur incapacité d'empêcher totalement la terminaison prématurée des chaînes protéiques qu'au fait que l'enzyme produit présente une activité altérée par l'insertion d'un acide aminé différent de celui présent chez l'enzyme des souches de type sauvage.

Dominance du caractère i^s recouvré après suppression d'i^si^-

Le résultat de l'expérience décrite ci-dessus fut l'obtention de:

24 $i^s i^-$ suppressibles parmi les 975 souches analysées

zéro $i^s o^c$ " 125 "

2 $i^s i^-$ qui donnent lieu au phénotype i^s dans des diploïdes $i^+ o^+ su^-/Fi^s i^-$, et seront analysés au chapitre V.

Nous avons ensuite vérifié, par dosage de la β-galactosidase, que le phénotype Lac^- obtenu par la suppression d'$i^s_{43} i^-$ était effectivement dû à la restauration du caractère i^s_{43} original, dominant sur l'allèle i^+ et ne permettant pas d'induction par l'IPTG 10^{-4}M. Ces résultats sont réunis au tableau XII, page 75.

Ces dosages confirment, pour les deux souches $i^s i^-_{230}$ et $i^s i^-_{721}$ analysées, le caractère i^s non inductible des diploïdes $Lac^+ su^+_1/Fi^s i^-$ qui, comparé à l'inductibilité des souches $Lac^+ su^-/Fi^s i^-$, est effectivement le résultat de la présence de l'allèle su^+_1. Le gène su^+_1 affecte en outre la constitutivité des mutants $i^s i^-$ qui, abolie chez les diploïdes $Lac^+ su^+_1/Fi^s i^-$, se manifeste encore partiellement chez les souches $Lac^+ su^-/Fi^s i^-$ du fait de la dominance imparfaite du gène i^+ sur son allèle i^-, que nous avons déjà illustrée au tableau IX. Afin d'éliminer cette interférence du gène i^+, l'étude quantitative de la suppression de 7 différents $i^s i^-$ par les quatre gènes su^+_1, 2, 3, ou 4 a été effectuée dans des souches portant la délétion X_{74} de la région Lac qui couvre le gène i^+.

Suppression quantitative de 7 souches $i^s i^-$ par 4 suppresseurs

L'intensité de couleur sur TTZ + Lac des diploïdes $Lac^+ su^+/Fi^s i^-_{sup.}$ varie, pour un même $i^s i^-$, d'une souche su^+ à l'autre. Tous les $i^s i^-$ suppressibles sont sensibles au su^+_1 tandis que quatorze d'entre eux seulement répondent au su^+_3. Aucun n'est supprimé par les su^+_2 et su^+_4 à un niveau suffisant pour être décelable sur boîtes TTZ. Ceci indique déjà que ces i^- diffèrent quant à leur sensibilité aux gènes suppresseurs. Nous avons étudié quantitativement la suppression par les 4 gènes su^+ utilisés chez 7 souches $i^s i^-$ apparaissant, sur milieu TTZ + Lac, comme les plus différentes dans leur réponse à ces suppresseurs. Cette analyse a été réalisée dans des souches su^- ou su^+ affectées de la délétion X_{74} de la région Lac qui, couvrant le gène i, élémine l'interférence de l'allèle i^+.

Les dosages d'activité de la β-galactosidase dans des diploödes de types

TABLEAU XII

CHROMOSOME / EPISOME	Δ_{Lac} su^-		Lac^+ su^-		Lac^+ su^+_1	
	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG
i^+	8	4000	5	4690	4	5850
$i^S 43$	8	12	6	130	2	224
$i^S i^- 230$	8120	6200	144	5020	6	291
$i^S i^- 721$	7000	6190	76	5620	2	460

Dominance du caractère i^S recouvré après suppression d'$i^S i^-$

Activité de la β-galactosidase (en unités par mgr de bactéries) après croissance en milieu minimum 63 au glycérol sans inducteur et avec IPTG 10^{-4}M de souches portant soit une délétion de la région Lac soit le génome de type sauvage $i^+ z^+ y^+$ et portant ou non la mutation su_1^+. Les souches hébergent des épisomes $z^+ y^+$ de génotype i indiqué dans la première colonne.

X_{74} $su^-/Fi^s i^-$ et X_{74} $su^+/Fi^s i^-$ sont présentés au tableau XIII, page 77.

Il en ressort, ainsi que l'on pouvait s'y attendre par analogie avec d'autres systèmes étudiés, que l'efficacité de restauration du phénotype i^s varie d'un gène su^+ à l'autre. La su_1^+ apparaît comme le plus efficace, suivi en ordre d'efficacité par les su_3^+, su_2^+ et su_4^+, ce dernier ne provoquant une suppression décelable que chez le mutant i^s_{43} i^-_{721} qui est aussi le plus efficacement supprimé par les su_1^+, su_2^+ et su_3^+.

Rappellons l'ordre d'efficacité observé dans le cas de mutations rII de T_4 et de la phosphatase alcaline:

organisme	mutants	ordre d'efficacité des su^+
E. coli	$i^s i^-$	$su_1^+ > su_3^+ > su_2^+ > su_4^+$
T_4	rII (64)	$su_1^+ > su_3^+ > su_2^+ > su_4^+$
E. coli	phosphatase alcaline (65,63)	$su_3^+ > su_1^+ > su_2^+ \simeq su_4^+$

Nos mutants $i^s i^-$ se comportent vis-à-vis des différents su^+ de façon analogue aux mutants rII de phage T_4, ces deux systèmes différant des mutants de la phosphatase alcaline à la fois par l'efficacité inversée de su_1^+, et su_3^+ et par leur réponse très faible à l'égard du su_4^+. Il est légitime de conclure que les mutations i^- analysées sont toutes de types amber. Il est possible que d'autres parmi les 24 i^- suppressibles soient de type "ochre", c'est-à-dire, par analogie avec les mutants rII de T_4, efficacement supprimés cette fois par su_4^+ et insensibles aux su_1^+, su_2^+, su_3^+. Nous n'avons toutefois pas poursuivi l'analyse systématique de l'ensemble des $i^s i^-$ suppressibles mais plutôt concentré nos efforts sur nos résultats négatifs de suppression d'$i^s o^c$.

Essais de suppression de mutations o^c

La fréquence de $\frac{24}{975}$ = 2,5% observée pour les i^- suppressibles est du même ordre de grandeur que celle rapportée pour les mutants suppressibles de la phosphatase alcaline. Le résultat $\frac{\text{zéro}}{125}$ obtenu pour les o^c suppressibles est donc marginal et demande l'examen d'un plus grand nombre d'o^c.

TABLEAU XIII

CHROMOSOME / EPISOME	Δ_{Lac} su^-		Δ_{Lac} su^+_1		Δ_{Lac} su^+_2		Δ_{Lac} su^+_3		Δ_{Lac} su^+_4	
	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG
i^+	8	4000	6	4400	10	4050	14	3900	4	6100
i^s43	8	12	10	18	18	18	15	13	4	4
i^s43i^-230	8120	6200	85	91	11600	12800	6080	5840	9450	7980
i^s43i^-555	6780	5780	89	100	1550	1840	214	216	7140	7390
i^s43i^-616	7500	8110	86	93	1280	1180	190	191	7560	7490
i^s43i^-721	7000	6190	63	71	1220	1820	152	142	5140	5160
i^s43i^-901	5070	5210	751	597	3450	3480	294	314	5630	5700
i^s43i^-774	7600	7000	1200	1550	12850	11550	2770	3350	9000	9750
i^s43i^-1058	5250	5600	450	400	1560	1300	140	120	6680	6620

Suppression de mutations i^-

Activité de la β-galactosidase (en unités par mgr de bactéries) après croissance en milieu minimum 63 au glycérol sans inducteur et avec IPTG 10^{-4}M de souches portant une délétion de la région Lac et différents gènes suppresseurs et hébergeant des épisomes z^+y^+ de génotype i indiqué dans la première colonne.

Nous avons repris des essais de suppression d'o^c dans des conditions légèrement modifiées. Afin d'augmenter la fréquence des mutants o^c par rapport aux i^- obtenus par réversion d'i^s, nous avons réisolé les papilles Lac^+ apparus sur des colonies d'une souche parente $T_6^s i_{43}^s su^-/Fi_{43}^s$ (voir tableau IX), homogénote pour le gène i_{43}^s dans laquelle seuls les constitutifs o^c se manifesteront sans nécessiter de recombinaison entre chromosome et épisome. La nature o^c des constitutifs obtenus sur l'épisome a été analysée par un nouveau transfert dans une souche $i_{43}^s su^- T_6^r$ (décrite au tableau IX) qu'ils rendent Lac^+ sur boîtes Mac au lactose. Nous avons ainsi isolé 545 nouveaux mutants $i_{43}^s o^c$ différents. Environ 15% seulement d'entre eux synthétisent un niveau de β-galactosidase suffisamment élevé pour donner lieu à des colonies blanches sur TTZ + lactose. Les autres forment des colonies d'un rose plus ou moins intense, rendant la détection d'une suppression éventuelle plus difficile que dans le cas des $i^s i^-$. Afin de pouvoir éliminer par T_6 les souches roses T_6^s donatrices d'épisome $F_{43}^s o^c$, nous avons utilisé dans notre analyse de suppressibilité des souches réceptrices $Lac^+ su^-$ ou $Lac^+ su^+$ toutes T_6^r dérivées des souches originales de Garen. Dans ces conditions nous n'avons pas non plus pu mettre en évidence d'o^c suppressible par l'un des su^+ utilisés. Ceci porte le total des o^c analysés à 545 + 125 = 670 et augmente la valeur statistique de notre résultat négatif. Nous pouvons conclure, sans aucun doute, que les o^c suppressibles, s'ils existent, sont beaucoup moins fréquent que les mutations suppressibles du gène i et d'autres gènes de structure de protéines. La signification de cette observation sera discutée ci-dessous.

III. Conclusions et discussion du Chapitre IV.

En résumé, nous avons démontré l'existence de mutants $i^s i^-$ chez lesquels la mutation i^- est phénotypiquement supprimée en présence des gènes su_1^+, su_2^+, su_3^+ et su_4^+ de mutations amber ou ochre. La restauration du phénotype Lac^-, surréprimé et dominant sur i^+, l'efficacité relative des différents su^+, ainsi que la fréquence (2,5%) de ces mutations indiquent une proche analogie avec l'action de ces su^+ dans d'autres systèmes et ne laisse aucun doute sur la nature "amber" des mutations i^- considérées. L'existence de mutations amber du gène i implique que ce gène est traduit en protéine, tandis que leur pouvoir d'inactiver le répresseur R^s démontre que la chaîne polypeptidique terminée prématurément chez les $i^s i^-$ intervient dans la structure du répres-

seur. Ce phénomène démontre que les mutations i^- suppressibles et i^s affectent la même unité génétique de traduction. Ou pourrait cependant concevoir qu'elles soient localisées dans deux gènes distincts d'un même opéron, tels que le gène site des mutations i^- suppressibles soit traduit avant le gène site des mutations i^s, qui subit ainsi l'effet de polarité des i^- amber. Cependant, l'existence de nombreuses mutations i^- non suppressibles par les suppresseurs d'amber ou ochre, et donc vraisemblablement non polaires, nous oblige à conclure que les mutations i^- et i^s sont localisées dans le même gène, i, traduit en une protéine participant à la structure du répresseur. Les deux effets distincts, constitutivité et surrépression respectivement, des mutations i^- et i^s du même gène i permettent d'attribuer au répresseur le double rôle d'inhiber l'expression de l'opéron Lac et de répondre aux inducteurs, propriétés qui, intactes au contraire chez le produit de l'allèle i^+, rendent compte de son comportement.

L'isolement de mutants constitutifs complémentant le génome i^+o^+ de souches su^- indique la participation de plusieurs sous-unités à la structure du répresseur. La faible fréquence et les caractéristiques de ces mutants complémentant permettront d'éliminer l'hypothèse selon laquelle le gène i serait constitué de plusieurs cistrons exprimés indépendamment. Ces phénomènes de complémentation font l'objet du chapitre V.

Il nous reste à discuter l'interprétation de nos essais négatifs de suppression d'o^c. Répétons qu'ils ne laissent aucun doute quant à la nature très différente des mutations o^c analysées et de mutations caractéristiques de gènes de structure. Il serait cependant hâtif d'en conclure que le gène opérateur n'est pas traduit en protéine, quoique ce soit certainement là l'interprétation la plus simple de ce résultat. Disons plutôt que la non-suppressibilité des o^c est conciliable avec l'hypothèse selon laquelle l'opérateur ne serait pas traduit et en accord avec le comportement, dominant en cis, des mutations o^c dans des diploïdes o^c/Fo^+ (34) ainsi qu'avec les observations indiquant que l'apparition du phénotype o^c dépend de délétions du gène o (3). La principale objection à interpréter les caractéristiques des o^c en termes de propriétés de l'opérateur nous semble résider dans le critère utilisé pour la détection des mutations o^c. Actuellement un o^c est <u>défini</u> en pratique, comme nous l'avons fait, par son comportement constitutif dominant en cis sur l'allèle o^+. Il est évident que, dans l'état de nos connaissances, un o^c éventuel qui serait récessif sur l'allèle o^+ sera rangé automatiquement dans la classe des i^-, confusion

entretenue faute d'une technique aisée et précise de localisation génétique.

Supposons que l'opérateur soit traduit en un protéine (O^+) ayant la propriété de s'associer à l'ADN ou l'ARNm opérateur, inhibant ainsi l'expression de l'opéron. Une nature covalente de cette association rendrait, par exemple, compte du caractère récessif de l'allèle O^+: ce caractère reflèterait non pas l'absence de protéine O mais seulement son incapacité d'agir en trans. Si l'on admet, par contre, que la protéine O est capable d'agir en trans, on peut concevoir que seule une délétion de l'opérateur puisse affecter cette association en produisant le phénotype o^c dominant sur l'allèle o^+. En effet, la protéine d'un opérateur de type sauvage, O^+, sera alors sans effet en trans parce qu'incapable de se lier à un opérateur affecté d'une délétion. En d'autres termes, le caractère récessif de o^+ sur o^c ne serait pas non plus dans ce cas dû à l'absence de protéine O^+ mais plutôt à la disparition de son site d'action. Ce modèle permet de prédire l'existence de trois types de mutations de l'opérateur qui sans provoquer de délétion de son ADN, produiraient un phénotype constitutif "o^c récessif" sur l'allèle o^+, tout comme i^- sur l'allèle i^+. Tel serait le cas de:

1. Mutations ponctuelles affectant l'affinité de la protéine O pour son site d'action, polynucléotide opérateur qui, n'ayant qu'une seule base modifiée, sera normalement sensible à la protéine O^+ produite par l'allèle o^+, dominant par conséquent.

2. Mutations ponctuelles provoquent l'apparition des triplets UAG ou UAA et résultant en la terminaison prématurée de la protéine O. Ces mutants synthétiseraient un fragment seulement de la protéine O^+ qui, ayant une affinité diminuée pour le polynucléotide opérateur, donnerait lieu à un phénotype constitutif, suppressible par les suppresseurs d'amber ou ochre. Le fait que nous n'avons pas pu mettre en évidence de tels mutants peut signifier soit que l'opérateur n'est pas traduit, soit que de tels mutants sont eux aussi récessifs par rapport à un opérateur de type sauvage et ont été placés par nous dans la classe de i^-. Ceci serait à nouveau le cas si le polynucléotide opérateur, ne présentant qu'une seule base anormale, pouvait lier la protéine O^+ plus efficacement que le fragment de protéine O en lequel il est traduit. Certains parmi les 24 mutants suppressibles que nous avons obtenu pourraient alors être de type o^c amber et non i^-. Ces $i^s o^c$ amber suppressibles

hypothétiques, récessifs par rapport à un opérateur O^+, devraient recouvrer le phénotype i^s:

- soit par suppression dans un diploïde $\Delta_{Lac}\, su^+/Fi^s o^c_{amber}$
- soit par complémentation, en absence de tout gène suppresseur su^+, entre les gènes i et o dans des diploïdes $i^+o^+su^-/Fi^s o^c_{amber}$ ou $i^-o^+su^-/Fi^s o^c_{amber}$

Aucun des 24 $i^s i^-$ suppressibles que nous avons isolés ne peut toutefois être de ce type, puisqu'ils ne retrouvent pas leur phénotype i^s par complémentation dans un diploïde $i^+o^+su^-/Fi^s i^-$. Deux dérivés constitutifs de i^s_{43} donnant lieu à une telle complémentation avec $i^+o^+su^-$ ont, en fait, été isolés en même temps que les 24 souches $i^s i^-$ suppressibles. L'étude de l'un d'entre eux, qui fait l'objet du chapitre V, a confirmé toutefois qu'il est de type $i^s i^-$ complémenté par i^+ et non pas de type "$i^s o^c$ récessif", puisqu'il ne donne pas lieu à cette complémentation dans une bactérie $i^-_3 o^+$.

Il reste donc que tout modèle rendant compte des propriétés connues des o^c en admettant que l'opérateur est traduit, prédit l'existence d'o^c suppressibles par les su^+ d'amber ou ochre et que nous n'avons obtenu aucun o^c de ce type, qu'ils soient dominants ou récessifs sur l'allèle o^+.

3. Micro délétions ou insertions de bases dans l'ADN opérateur, provoquant un déphasage de lecture des triplets de son ARNm sans influencer la phase de lecture de gènes z, y, et a. Elles résulteraient en la synthèse d'une protéine opérateur qui, extrèmement différente de celle de type sauvage, n'aurait qu'une affinité réduite pour le polynucléotide opérateur et permettrait l'expression d'un phénotype constitutif. Si ce phénotype est dominant en cis par rapport à un allèle o^+, cette hypothèse entraîne la prédiction intéressante que les agents mutagènes induisant chez les bactéries des déphasage de lecture (66) devraient augmenter considérablement la fréquence des mutations o^c. On peut cependant concevoir, encore une fois, que l'ADN ou l'ARNm de tels mutants, ne présentant que très peu de bases anormales, puisse lier la protéine O^+ produite par un opérateur de type sauvage et ceci plus efficacement que la protéine en laquelle il est traduit. Dans ce cas ces mutants seraient,

eux aussi, récessifs par rapport à un opérateur o^+ en trans, et classés parmi les i^-.

En conclusion, le fait que nous n'avons observé de mutant o^c qui soit suppressible ni parmi les 670 mutants constitutifs dominants ni parmi les 975 constitutifs récessifs analysés, nous semble constituer un argument puissant en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'opérateur n'est pas traduit en protéine.

Cette absence de suppression est à rapprocher d'un résultat négatif qui nous fut communiqué par F. Jacob à savoir l'absence de mutants o^c thermosensibles parmi 10.000 o^c examinés.

La mise au point d'une technique aisée et précise de localisation génétique des mutants constitutifs offrirait toutefois le seul critère objectif,nous semble-t-il, pour distinguer les mutants o^c des i^-. Elle fournirait l'assurance que les délétions o^c dominantes sur o^+, seules observées jusqu'à ce jour, ne représentent pas des cas particuliers de mutations de l'opérateur.

CHAPITRE V

COMPLEMENTATION ENTRE MUTANTS DU GENE i.

I. Introduction

Le modèle attribuant au répresseur les propriétés d'une protéine allostérique en suggère une structure oligomérique ainsi que nous l'avons exposé au chapitre I. L'existence d'un effet homotrope entre ses sites I reflèterait l'interaction de plusieurs protomères présentant chacun un ou plusieurs sites I.La nécessité d'attribuer à R un site O, différent de I, soulève la question de savoir si ce protomère de R est constitué par association de peptides identiques déterminant à la fois les sites I et O ou si, au contraire, plusieurs peptides différents, l'un modelant le site I l'autre le site O, interviennent dans la structure de ce protomère. L'hypothèse de plusieurs peptides distincts est d'autant plus vraisemblable que Gerhardt et Schachman (67) ont démontré que la molécule de transcarbamylase de l'acide aspartique, enzyme à comportement allostérique, était constituée de sous-unités de deux types: 4 sous-unités régulatrices associées à 2 sous-unités catalytiques. La sous-unité catalytique porte le récepteur spécifique de l'aspartate, l'autre, régulatrice, celui de la cytidine-triphosphate, affecteur allostérique.

Cette situation n'est toutefois pas nécessaire au comportement allostérique d'une protéine et ne semble d'ailleurs pas générale. Les données de Appella et Tomkins (68) notamment indiquent que la déshydrogénase glutamique est constituée au contraire de peptides identiques.

La seule indication d'une nature polymérique du répresseur était,jusqu'à présent, l'existence d'un mutant chez lequel la synthèse de R est thermosensible. Le comportement de ce mutant, isolé et étudié par Sadler et Novick (15), suggère l'intervention au cours de la synthèse de R d'une réaction de polymérisation de sous-unités qui, chez ce mutant, seraient déficientes précisément quant à leur capacité de s'associer.

L'existence de sous-unités du répresseur prédit des phénomènes de complémentation entre allèles du gène i. Nous avons isolé deux mutants constitutifs de type $i^s i^-$ capables de complémenter le gène i^+ en restaurant le comportement i^s du répresseur. Nous n'avons étudié, dans le cadre de ce travail, que les

caractéristiques de complémentation d'un seul de ces deux mutants, $1'i^{s}i^{-}_{636}$. Nous confirmerons, notamment, que la constitutivité de ce mutant doit être attribuée à une mutation i^{-} du gène i^{s} et non à une mutation o^{c} récessive de l'opérateur, du type qui a été discuté au chapitre IV. La complémentation observée a donc lieu entre allèles du gène i, et confirme que le répresseur, produit de ce gène, est constitué de plusieurs sous-unités.

L'observation de la fréquence de mutants $i^{s}i^{-}$ complémentant le gène i^{+} éliminera, en outre, l'hypothèse selon laquelle le gène i serait constitué de plusieurs cistrons dont l'expression serait indépendante. Cette fréquence, ainsi que la complexité des phénomènes de complémentation étudiés, suggèrent qu'il s'agit de complémentations intra- plutôt que intercistroniques. Nos résultats sont interprétés le plus simplement par la nature monocistronique de i mais ne permettent toutefois pas de décider définitivement si le protomère du répresseur résulte de l'association de sous-unités identiques ou différentes.

II. Résultats

Isolement et fréquence de mutants $i^{s}i^{-}$ complémentant le gène i^{+}

L'isolement à partir de la souche $\Delta_{X74}su^{-}/Fi^{s}_{43}$ des deux épisomes $Fi^{s}i^{-}_{636}$ et $Fi^{s}i^{-}_{1092}$ dont le phénotype i^{s}, rose sur TTZ + lac, est restauré partiellement dans les diploïdes de type $i^{+}o^{+}z^{+}y^{+}su^{-}/Fi^{s}i^{-}$, a été décrit au chapitre IV. Ces deux souches se sont avérées i^{-} récessives sur $i^{s}Y18$ dans les diploïdes $i^{s}_{Y18}su^{-}/Fi^{s}i^{-}_{636}$ et $i^{s}_{Y18}su^{-}/Fi^{s}i^{-}_{1092}$. Elles étaient les seules, parmi les 975 souches $i^{s}i^{-}$ isolées au cours de cette expérience, à manifester ce phénomène de complémentation en présence du génome $i^{+}o^{+}$.

Etude quantitative de la complémentation

a) Complémentation entre $i^{s}_{43}i^{-}_{636}$ et i^{+}

Nous avons mesuré la synthèse constitutive et induite de β-galactosidase de deux souches su^{-} identiques sauf quant à leur région Lac et hébergeant toutes deux l'épisome $Fi^{s}i^{-}_{636}z^{+}y^{+}a^{+}$. L'une porte la délition X_{74} couvrant toute la région Lac, gène i compris, l'autre est Lac^{+} ($i^{+}z^{+}y^{+}a^{+}$). Les résultats sont réunis au tableau XIV, page 85.

TABLEAU XIV

Gène i		β-galactosidase	
chromosome	épisome	sans inducteur	+IPTG
i^+		3	3.900
ΔLac	$i^s i^-_{636}$	9.000	8.550
i^+	$i^s i^-_{636}$	510	1.600

Complémentation entre $i^s_{43} i^-_{636}$ et i^+

Activité de la β-galactosidase (en unités par mgr de bactéries) après croissance à 32° en milieu minimum 63 au glycérol sans inducteur et avec IPTG 10^{-4}M de souches (su^-) portant soit la délétion X_{74} couvrant les gènes i, o, z, y et a de la région Lac soit le génome de type sauvage $i^+z^+y^+$, et hébergeant ou non l'épisome $i^s i^-_{636} z^+y^+$.

Ils indiquent que le gène $i^s i^-$, donnant lieu à une synthèse constitutive maximum dans le diploïde $\Delta_{X74}/Fi^s i^-_{636} z^+$, est récessif sur l'allèle i^+ réduisant la synthèse constitutive du diploïde $i^+ z^+/Fi^s i^-_{636} z^+$ à 510 U/mgr de β-galactosidase, activité constitutive résiduelle que nous avons déjà mentionnée dans le cas du diploïde i^+/Fi^-_3 au tableau IX. L'IPTG 10^{-4}M ne permet toutefois que la synthèse de 1600 U/mgr de β-galactosidase chez ce diploïde $i^+/Fi^s i^-_{636}$, ce qui démontre le caractère i^s, surréprimé et dominant sur i^+, du phénotype obtenu ici en absence de tout gène su^+.

b) Complémentation entre $i^s_{43} i^-_{636}$ et $i^+ o^+ z^o$ à deux températures.

Nous avons confirmé que la restauration au phénotype i^s de $i^s_{43} i^-_{636}$ est indépendante de l'expression des gènes de structure z, y, et a de l'opéron Lac. Elle ne peut donc être attribuée, par exemple, à la synthèse par l'opéron $i^s i^-_{636} z^+$ d'une β-galactosidase active mais anormale dont les sous-unités, associées à celles de β-galactosidase normale, produiraient une enzyme de faible activité. Les résultats du tableau XV, page 87, montrent le caractère i^s d'un diploïde hébergeant l'épisome, $Fi^s_{43} i^-_{636}$ et dont le chromosome est de génotype $i^+ o^+ z^o$, c'est-à-dire affecté de la mutation ochre z^-_{118} du gène z empêchant la traduction de l'opéron Lac.

Afin de rendre ces résultats plus démonstratifs nous avons comparé l'activité de β-galactosidase synthétisée par les divers diploïdes analysés après croissance à 30° et à 42°. Nous avons montré, en effet, que le caractère i^s est accentué à basse température (tableau V) et avons voulu vérifier, en outre, que le répresseur formé par complémentation entre $i^s i^-_{636}$ et i^+ n'est pas thermolabile. Il s'est confirmé (tableau XV) que le diploïde $i^+ o^+ z^o_{118}/Fi^s i^-_{636}$ manifeste le phénotype i^s, dominant sur i^+ et nettement plus surréprimé à 30° qu'à 42° (664 contre 5.778 U de Z/mgr en présence d'IPTG 10^{-4}M).

c) Complémentation entre mutants i^-

La souche $i^-_3 o^+$ utilisée dans cette expérience est capable de complémenter partiellement le gène i^-_{G23} en restaurant un génotype i^+ à synthèse constitutive élevée toutefois (3.920 U de Z/mgr). Ce phénomène, observé par J. Monod (résultats non publiés) se trouve confirmé ainsi que le montre le tableau XVI, page 88.

TABLEAU XV

	Délétion Lac X_{74}				$i^+o^+z^0_{118}$			
	30°		42°		30°		42°	
	sans ind.	IPTG 10^{-4}M	sans ind.	IPTG 10^{-4}M	sans ind.	IPTG 10^{-4}M	sans ind.	IPTG 10^{-4}M
i^+	6	5.690	9	5.420	3	5.770	7	10.060
i^-_{43}	5	4	8	12	3	20	10	236
i^-_3	8.110	7.350	6.120	5.510	675	7.220	846	11.300
$i^s_{43}i^-_{636}$	6.000	6.090	6.510	6.220	165	660	375	5.780

Complémentation entre $i^s_{43}i^-_{636}$ et $i^+o^+z^0_{118}$ à deux températures.

Les souches utilisées, identiques sauf pour la région Lac, sont dérivées de la souche FS26-19 ($F^-Lac^+su^-$) de Garen dans laquelle nous avons substitué au génome Lac^+ soit la délétion X_{74} de la région Lac soit le génome $i^+z^0_{118}$ (par intégration de ce génome introduit sous forme d'un épisome $i^+z^0_{118}$ suivie de l'élimination de cet épisome par traitement à l'acridine orange). Les deux souches ainsi obtenues ont reçu l'un ou l'autre des 4 épisomes z^+y^+ différant par la nature du gène i et l'activité spécifique de β-galactosidase (exprimée en U/mgr de bactéries) des 8 souches diploïdes ainsi construites mesurée au cours de leur croissance exponentielle à 30° ou à 42° en milieu 63 au glycérol contenant 10% du volume de bouillon et additionné ou non d'IPTG 10^{-4}M

TABLEAU XVI

gène i d'épisomes z^+y^+ \ chromosome	Délétion Lac X74		$i^-{}_3o^+z^+y^+a^+$	
	sans ind.	+IPTG 10^{-4}M	sans ind.	+IPTG 10^{-4}M
sans épisome	-	-	3.060	3.210
i^+	6	5.690	73	5.590
$i^s{}_{43}$	5	4	104	99
$i^-{}_3$	8.110	7.350	7.510	6.780
$i^-{}_{G23}$	7.850	6.580	3.920	7.580
$i^s{}_{43}i^-{}_{636}$	6.000	6.090	5.900	6.210

Complémentation entre mutants i^-

Les souches utilisées sont $X_{74}su^-$ et 2300e (F. Jacob). Les mutations $i^-{}_3$ et $i^-{}_{G23}$ ont été obtenues à partir d'une souche i^+ par F. Jacob. L'activité spécifique de β-galactosidase (U/mgr de bactéries) des diverses souches a été mesurée au cours de leur croissance exponentielle à 30° en milieu 63 au glycérol contenant 10% du volume de bouillon et additionné ou non d'IPTG 10^{-4}M.

On voit que la souche i^-_3 ne peut pas, d'autre part, complémenter $i^s i^-_{636}$, ce qui illustre la complexité des phénomènes de complémentation entre mutants i^- : certaines paires d'i^- (i^-_3 et i^-_{G23}) donnent lieu à une complémentation, mais la plupart d'entr'eux (973 $i^s i^-$ examinés) ne peuvent être complémentés par i^+. Ce résultat négatif a, toutefois, l'intérêt de confirmer la nature i^-, et non "o^c récessif", du mutant $i^s i^-_{636}$. En effet, s'il était "o^c récessif" du type discuté au chapitre IV, l'$i^s i^-_{636}$ verrait son phénotype i^s restauré en présence de l'opérateur o^+ du chromosome $i^-_3 o^+$ de la souche 2300e.

III. Conclusions et discussion du chapitre V

L'existence parmi 975 mutants $i^s i^-$ analysés de 2 mutants complémentant le gène i^+ nous semble être expliquée le plus simplement par l'hypothèse selon laquelle le gène i serait constitué d'un seul cistron. Ces phénomènes de complémentation résulteraient alors de l'association de sous-unités (R^{IO}) du répresseur définissant à la fois les sites I et O. Ces sous-unités, déficientes chez les mutants $i^s i^-$ (R^{s-}), s'associeraient à des sous-unités normales (R^{IO}) produites par le gène i^+ en formant un répresseur hybride de structure $R^{s-}_m R^{IO}_n$. Les sous-unités R^{IO} contribueraient à sa capacité de reconnaître l'opérateur tandis que les sous-unités R^{s-} seraient responsables de son caractère surréprimé. La basse fréquence de ces complémentations intracistroniques refléterait la faible probabilité que des sous unités doublement mutées (R^{s-}) conservent la propriété de s'associer à des sous-unités de type sauvage.

Considérons à présent les interprétations de ces rares cas de complémentation sur la base de modèles polycistroniques du gène i. Deux possibilités doivent alors être envisagées:

A. Les mutations i^s et i^- affectent toujours deux cistrons différents.
Il est évident que si deux cistrons r^I (siège des mutations i^s) et r^O (siège des mutations i^-) synthétisaient indépendamment deux peptides R^I et R^O portant les sites I et O respectivement, tous les mutants $i^s i^-$ devraient recouvrer le phénotype i^s par complémentation avec l'allèle i^+. Remarquons qu'une telle situation aurait d'ailleurs rendue impossible la mise en évidence de suppression d'i^-. La basse fréquence que nous avons observée élimine ce modèle simple. Elle nous force à admettre en outre que l'expression du cistron r^I dépend de la synthèse en cis de sous-unités R^O. En effet, la présence de sous-

unités R^O synthétisées par un allèle sauvage en trans ne permet pas (dans 973 cas sur 975) la formation d'un répresseur hybride de type $R^O R^S$ aux propriétés surréprimées, indice que le peptide R^S n'est pas synthétisé dans ces conditions. Cette influence, en cis seulement, de mutations du cistron r^O sur l'expression du cistron r^I revient à dire que presque toutes les mutations i^- auraient un effet polaire sur le cistron r^I. Cette supposition nécessaire, qui ne trouve d'analogie dans aucun autre système connu, rend ce modèle peu probable.

B. Les mutations i^S et i^- affectent généralement le même cistron. Le gène i comporterait cependant un autre cistron (p) synthétisant un peptide nécessaire à l'activité du répresseur. Il nous faut alors introduire une hypothèse supplémentaire pour expliquer pourquoi la plupart des mutations du cistron p ne donnent pas lieu à des mutants i^-. On doit supposer, par exemple, la présence de deux copies du cistron p, en sorte que seules de rares délétions touchant ces deux cistrons entraîneraient un phénotype i^- complémenté par l'allèle sauvage p^+.

En conclusion, l'existence de phénomènes de complémentation rend vraisemblable le fait que le répresseur serait constitué de sous-unités. Leur basse fréquence et leurs caractéristiques suggèrent qu'il s'agit de complémentations intracistroniques. Leur interprétation sur la base de modèles polycistroniques du gène i implique des suppositions supplémentaires peu probables. L'interprétation la plus vraisemblable de ces phénomènes est donc que le répresseur serait formé de sous-unités identiques contribuant à ses propriétés allostériques.

CHAPITRE VI

RESUME, DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS DU TRAVAIL

I. Résumé des principaux résultats et de leur interprétation

Nous avons isolé et caractérisé une série de nouveaux mutants régulateurs surréprimés (i^s) de l'opéron Lac de E. coli. L'existence de ces mutants confirme le modèle de régulation proposé par Monod et al. (10) modèle que nous avons présenté au chapitre I et adopté comme hypothèse de travail.

Les mutants i^s ont été décelés par leur phénotype Lac^- sur boîtes indicatrices au lactose. Ces mutations pléitropes i^s diminuent la réponse aux inducteurs dans une mesure variant d'un mutant à l'autre, sans changer toutefois la spécificité ou l'efficacité relative des inducteurs. Ce comportement fut interprété comme le résultat de mutations du gène i diminuant l'affinité du répresseur (R), produit de ce gène, pour les inducteurs. Tous les mutants i^s synthétisent en absence d'inducteur au taux de β-galactosidase identique à celui synthétisé dans ces conditions par les bactéries de type sauvage i^+, et ceci à 42^o comme à 37^o ou 30^o. Ces mutations ne semblent donc affecter ni la thermosensibilité de R ni son affinité pour l'opérateur. Elles sont toutes dominantes sur les allèles i^+ et i^- dans des diploïdes portant les paires de gènew i^s/i^+ ou i^s/i^-. Leur dominance sur l'allèle i^+ n'est toutefois pas totale, même dans une bactérie déficiente quant à sa capacité de se recombiner (Rec^-). L'inductibilité des diploïdes i^+/i^s plus élevée que celle des i^s/i^s, n'est donc pas due à la présence de recombinants i^+/i^+ mais doit, vraisemblablement,être interprétée sur la base de phénomènes de complémentations intracistroniques tels que ceux démontrés au chapitre V. Les mutations i^s permettent l'expression constitutive d'un opérateur muté o^c en trans dont la présence augmente d'ailleurs la sensibilité aux inducteurs des i^s comme des i^+. L'isolement de souches $i^s o^+/i^s o^+$ à partir de diploïdes $i^s o^+/i^+ o^c$ localise tous les i^s dans la région de l'ADN limitée à l'épisome utilisé, c'est-à-dire la région Lac et les segments d'ADN directement contigus. Ces caractéristiques d'induction et de dominance des i^s sont compatibles avec l'hypothèse de leur localisation dans le gène i. Nous avons en outre confirmé qu'elles ne pouvaient être attribuées à des mutations dominantes de l'un des gènes de structure de l'opéron Lac et vérifié, notamment, que la β-galactosidase de mutants i^s est normale. Le travail de Burstein et al. (38) a révélé, en effet, le rôle de la β-galactosidase

dans la transformation du lactose en sucres inducteurs. La présence chez les i^s d'une β-galactosidase anormale transformant le lactose, et peut-être d'autres produits intermédiaires du métabolisme, en inhibiteurs d'induction, pourrait expliquer leur comportement surréprimé et dominant. Cette hypothèse fut éliminée par le fait que la β-galactosidase induite par l'IPTG chez certains i^s exerce in vivo comme in vitro, une action sur le lactose que nous n'avons pu discerner de celle de la β-galactosidase de bactéries de type sauvage i^+. L'induction des mutants i^s n'est, d'autre part, pas plus sensible que celle des i^+ à l'effet inhibiteur du glucose. Enfin, une mutation i^s exprime son comportement surréprimé et dominant aussi bien dans une souche libérée par mutation de la "répression catabolique" que dans une souche de type sauvage, où l'induction des enzymes de l'opéron Lac est sensible au glucose et aux produits de son métabolisme. Ces données éliminent à la fois la possibilité que les mutants i^s produisent un inhibiteur d'induction et celle que leur répresseur soit anormalement sensible à l'effet anti-inducteur du glucose ou d'autres métabolites. Elles sont, au contraire, en accord avec l'hypothèse que le répresseur des i^s présenterait moins d'affinité pour les inducteurs, propriété que nous avons essayé de vérifier plus directement par la forme de leur courbe d'induction en fonction de la concentration d'IPTG. Le modèle allostérique prévoit qu'un changement d'affinité pour un effecteur (tel l'IPTG) puisse être accompagné d'une variation de son effet homotrope coopératif observé à faible concentration. Cet effet de coopérativité de l'IPTG se manifeste, toutefois, de façon pratiquement identique chez l'i^s_{14A} et chez une souche i^+. Ce résultat négatif n'est toutefois pas en contradiction avec le modèle allostérique. Enfin nous avons établi que le mode de réversion des i^s au phénotype Lac^+ par apparition de mutations constitutives i^- ou o^c, mis en évidence par Willson et al. (29) pour deux d'entr'eux, est caractéristique de tous les i^s. Nous avons mis au point une nouvelle technique de coloration spécifique de souches constitutives, technique qui est particulièrement sensible, non sélective, et applicable à la détection des mutants constitutifs dérivés de bactéries i^+ aussi bien que i^s. Cette technique nous a permi de comparer la fréquence de ces mutations chez deux souches, i^s ou i^+, et d'établir que cette fréquence, de l'ordre de 1 à 2.10^{-7}, est identique dans les deux cas. Ce résultat confirme notre interprétation des mutations i^s chez lesquelles l'effet du répresseur muté peut être réversé soit par inactivation du gène i soit par inactivation de l'opérateur. Enfin nous avons analysé le comportement de doubles mutants $i^s i^-$ dans un diploïde en présence, en trans, d'un opéron Lac de type $i^+ o^+ z_o$ dont les gè-

nes de structure ne peuvent être traduits du fait de la présence d'une mutation polaire extrême du gène z. Cette analyse ne laisse aucun doute quant au fait que l'opérateur et tous les gènes de structure des enzymes de l'opéron sont intacts chez tous les i^S. Ce résultat indique le gène i comme seul siège possible de ces mutations.

La suite de notre travail fut consacrée à des expériences de suppression de mutations i^- et o^c par des gènes su^+ bien caractérisés. Ces suppresseurs, en agissant au niveau de la traduction en protéine des gènes portant une mutation amber ou ochre, réversent l'effet de telles mutations. Leur action suppressive constitue donc une preuve que les mutations dont ils abolissent l'effet touchent des gènes traduits en protéines. C'est ce principe que nous avons appliqué pour découvrir si les gènes i et o déterminent ou non la structure de protéines. L'utilisation de dérivés i^Si^- et i^So^c nous a fourni une méthode de détection rapide et sensible de phénomènes éventuels de suppression de mutations i^- ou o^c, grâce au fait que su^+ restaurerait le phénotype i^S, Lac^- et dominant sur les allèles i^+ et i^-. L'analyse de 975 souches i^Si^- différentes a révélé la présence parmi elles de 24 mutants chez lesquels la mutation i^- est suppressible. La nature, typiquement i^S, du phénotype restauré, la fréquence des mutations i^- suppressibles l'efficacité relative des différents suppresseurs ne laissent aucun doute quant à la nature "amber" des mutations i^- supprimées. Ce résultat impose la conclusion que le gène i est traduit en protéine. Il confirme que les mutations i^S et i^- touchent le même gène, i, qui détermine la structure du répresseur à laquelle participe la protéine en laquelle i est traduit. L'analyse de 670 mutants i^So^c de phénotype constitutif dominant sur l'allèle o^+ n'a, au contraire, pas mis en évidence un seul o^c suppressible. Tenant compte de la possibilité que certains mutants constitutifs de l'opérateur puissent être récessifs sur l'allèle o^+, nous avons démontré qu'aucun des 24 mutants suppressibles, décrits ci-dessus comme étant i^Si^-, ne peut être de type "o^c récessif". Il ressort de cette étude que nous n'avons observé aucun mutant o^c suppressible, ni parmi les 670 constitutifs dominants sur l'allèle o^+ ni parmi les 975 constitutifs récessifs sur o^+, que nous avons examinés. Ce résultat, quoique négatif, constitue, nous semble-t-il, un fort argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'opérateur, contrairement au gène i, ne serait pas traduit en protéine.

Dans la troisième partie de ce travail, nous rapportons l'isolement de deux

mutants $i^s i^-$ donnant lieu, en présence du gène i^+ dans un diploïde à un phénomène de complémentation provoquant l'apparition d'un répresseur actif de type surréprimé. L'analyse d'un de ces mutants a confirmé sa nature i^- et la nécessité du gène i^+ pour en restaurer le phénotype i^s. Le phénomène observé résulte, par conséquent, d'une complémentation entre les allèles $i^s i^-$ et i^+ du gène i. Il indique l'intervention de sous-unités dans la structure du répresseur. La basse fréquence des $i^s i^-$ complémentant suggère que leur complémentation par i^+ est de type intracistronique. Le répresseur serait donc, vraisemblablement, constitué de sous-unités identiques. Cet indice d'une nature oligomérique du répresseur contribue à la vraisemblance du modèle qui lui attribue les propriétés d'une protéine allostérique.

II. Discussion générale et conclusions

La valeur de chaque expérience et de leurs interprétations a été discutée en fin des chapitres. Nous soulignerons ici quelques expériences à poursuivre ainsi que des analogies entre le système étudié et d'autres systèmes connus. Ces rapprochements appuyeront les conclusions de notre travail.

Malgré l'absence d'une localisation génétique précise il subsiste peu de doutes quant au fait que les mutations surréprimées touchent le gène i. Leurs caractéristiques sont compatibles avec leur interprétation sur la base d'une diminution d'affinité du répresseur pour les inducteurs. A titre de confirmation, la comparaison de l'effet coopératif des inducteurs chez les i^+ et les différents i^s mérite des essais supplémentaires. Rappelons que nous n'avons mesuré cet effet que chez un seul i^s et des moins surréprimés. Le résultat négatif que nous avons obtenu dans ce cas nous rendrait d'autant plus confiants dans la signification d'un résultat positif qui serait obtenu chez une souche identique à celle analysée sauf en ce qui concerne la mutation i^s. L'effet de la chaleur, qui augmente l'inductibilité des i^s, pourrait rendre plus sensibles des variations de coopérativité des inducteurs dues aux mutations i^s. Remarquons l'analogie entre l'effet de la température sur l'inductibilité et sur la liaison de certains effecteurs d'enzymes à comportement allostérique. Taketa et Pogell (69) ont découvert que la fructose 1-6 di-phosphatase de foie de rat est 10 fois plus sensible à l'adénosine 5'-monophosphate à 20^o qu'à 38^oC et y est 100 fois plus sensible à 2^o qu'à 46^oC. O'Donovan et Ingraham (70) ont montré un comportement analogue de la phosphoribosyl-ATP pyrophos-

phorylase de E. coli, plus fortement inhibée par l'histidine à 20° qu'à 37°C. Dans le cas du répresseur, la chaleur pourrait diminuer son affinité pour l'opérateur ou augmenter celle à l'égard des inducteurs. Citons aussi deux exemples faisant ressortir une analogie entre l'effet des mutations i^s et de mutations du gène de structure d'enzymes allostériques. Changeux (71) a démontré que des mutations du gène de structure de la L-thréonine désaminase de biosynthèse peuvent entraîner une altération profonde de ses propriétés allostériques. L'enzyme de type sauvage est inhibée par l'isoleucine et activée par la valine. Il a isolé une série de mutants dont la L-thréonine désaminase est enzymatiquement active mais modifiée dans ses propriétés régulatrices. Ces enzymes modifiées varient dans leur réponse à l'isoleucine et la valine à des degrés allant d'une inhibition à une activation par l'isoleucine et/ou la valine. Quant à la phosphoribosyl-ATP pyrophosphorylase étudiée par O'Donovan et Ingraham (70) son activité est inhibée à 50% par des concentrations d'histidine allant de 8×10^{-8}M à 10^{-2}M selon le mutant considéré. Des mutations du gène de structure d'une protéine allostérique peuvent donc engendrer une large gamme de protéines ayant conservé leur activité mais variant dans leur affinité à l'égard de certains effecteurs. Ces exemples présentent une analogie remarquable avec le comportement de la famille de mutants i^s que nous avons isolés. Ils rendent extrêmement vraisemblable leur interprétation selon laquelle, sans inactiver le répresseur, ces mutations engendreraient différentes affinités de son site "inducteur" pour ses ligands. On peut aussi prévoir l'existence de mutations du gène i augmentant l'affinité du répresseur pour les inducteurs. Ceci donnerait lieu à des mutants inductibles par des concentrations d'inducteur plus faibles que cells induisant les bactéries i^+. De tels mutants viennent d'être isolés par B. Müller-Hill (communication personnelle) et sont actuellement à l'étude. Rappelons que nous n'avons pas écarté définitivement la possibilité que certains i^s seraient plutôt hyperproducteurs de répresseur et avons proposé certaines expériences susceptibles de vérifier cette hypothèse.

Nos expériences de suppression de mutations i^- amber démontrent la nature protéique du produit du gène i et son intervention dans la structure du répresseur. Il subsiste toutefois la possibilité que le répresseur actif soit constitué de cette protéine associée à un polynucléotide, tel l'ARN-m du gène i par exemple. La restauration du phénotype i^s par suppression de la mutation i^- de doubles mutants $i^s i^-$ suggère que les mutations i^s et i^- sont localisées dans le même cistron. Ceci se trouva confirmé par l'observation de rares phé-

nomènes de restauration du phénotype i^s de mutants $i^s i^-$ en présence de l'allèle i^+, phénomènes devant être interprétés comme des complémentations intracistroniques entre allèles du gène i. La faible fréquence de ces complémentations (2/1000) indique que les mutations i^s et i^- étudiées affectent le même cistron et suggère une nature monocistronique du gène i. Les données de Gerhardt et Schachman (67), mentionnées auparavant, incitent à attribuer au protomère du répresseur deux peptides différents déterminant l'un le site "I", l'autre le site "O". L'attribution à i de deux cistrons nécessite cependant des suppositions peu probables, que nous avons développées dans la discussion de ces résultats. Il est donc plus vraisemblable que le répresseur soit constitué de sous-unités identiques.

Nos résultats négatifs de suppression d'o^c, d'autre part, sont significatifs, grâce au grand nombre d'o^c examinés ainsi que du fait que nous avons tenu compte de l'existence éventuelle de "o^c récessifs" sur l'allèle o^+. Ils suggèrent que l'opérateur n'est pas traduit en protéine. Rappellons la possibilité qu'il soit transcrit en ARN-m.

Nous avons mentionné dans l'introduction de ce travail divers modèles rendant compte des phénomènes d'induction. Tous les modèles basés sur la traduction en protéine de l'opérateur devront à présent tenir compte de nos résultats négatifs de suppression d'o^c. Leur interprétation nécessitera, sans doute, des hypothèses supplémentaires rendant les modèles de ce type peu probables. Nous avons démontré la participation à la structure du répresseur d'une protéine dont les propriétés allostériques sont confirmées par le comportement des mutants i^s et l'existence de sous-unités complémentables. Ces indications suggèrent le type de techniques et de critères chimiques à utiliser dans des essais d'isolement et de dosage du répresseur <u>in vitro</u>. On ne peut tirer une conclusion définitive des données que nous avons réunies. Elles constituent, toutefois, un ensemble d'arguments à l'appui d'une protéine allostérique répresseur, liant l'inducteur et agissant au niveau d'un opérateur non traduit.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1 - Jacob, F. et Monod, J. (1961). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., XXVI, 193.

2 - Jacob, F. et Monod, J. (1961). J. Mol. Biol., 3, 318.

3 - Jacob, F., Ullman, A. et Monod, J. (1964). C. R. Acad. Sci., 258, 3125.

4 - Green, M. H. (1964). Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 1388.

5 - Maitra, U., Novogrodsky, A., Baltimore, D. et Hurwitz, J. (1965). Biochim. Biophys. Res. Comm., 18, 801.

6 - Bremer, H., Konrad, M. W., Gaines, K. et Stent, G. S. (1965). J. Mol. Biol., 13, 540.

7 - Salas, M., Smith, M., Stanley, W., Wahba, A. et Ochoa, S. (1965). J. Biol. Chem., 240, 3988.

8 - Terzaghi, E., Okada, Y., Streisinger, G., Tsugita, A., Inouye, M. et Emrich, J. (1965). Science, 150, 387.

9 - Attardi, G., Naono, S., Rouvière, J., Jacob, F. et Gros, F. (1965) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., XXVIII, 363.

10 - Monod, J., Changeux, J. P., Jacob, F. (1963) J. Mol. Biol., 6, 306.

11 - Monod, J., Wyman, J. et Changeux, J. P. (1965) J. Mol. Biol., 12, 88.

12 - Changeux, J. P. (1963) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 497.

13 - Kent, A. B., Krebs, E. G. et Fischer, E. H. (1958) J. Biol. Chem., 232, 549.

14 - Horiuchi, T. et Novick, A. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 108, 687.

15 - Sadler, J. R. et Novick, A. (1965) J. Mol. Biol., 12, 305.

16 - Boezi, J. A. et Cowie, D. B. (1961) Biophys. Journal, 1, 639.

17 - Brenner, S. (1965) Brit. Med. Bull., 21, 244.

18 - McAuslan, B. R. (1963), Virology, 21, 383.

19 - Lederberg, J. et Lederberg, E. M. (1952) J. Bacteriology, 63, 399.

20 - Hirota, Y. (1960) Genetics, 46, 57.

21 - Messer, W. et Vielmetter, W. (1965) Biochim. Biophys. Res. Comm., 21, 182.

22 - Cohn, M. et Monod, J. (1951) Biochim. Biophys. Acta, 7, 153

23 - Horiuchi, T., Tomizawa, J. et Novick, A. (1962) Biochim. Biophys. Acta, 55, 152.

24 - Kepes, A. (1960) Biochim. Biophys. Acta, 40, 70.

25 - Berg, P. (1956) J. Biol. Chem., 222, 991.

26 - Jeanes, A., Wise, C. S. et Dimler, R. J. (1951) Anal. Chem., 23, 415.

27 - Partridge, S. M. (1949) Nature, 164, 443.

28 - Jacob, F. et Monod, J. (1963) Proc. 5th Intern. Congr. Biochem., 1, 132.

29 - Willson, C., Perrin, D., Cohn, M., Jacob, F., Monod, J. (1964) J. Mol. 8, 582.

30 - Adelberg, E. A., Mandel, M. et Chein Ching Chem, G. (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 788.

31 - Gero, S. D. et Burstein, C. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 117, 314.

32 - Monod, J. (1956) dans Enzymes: Units of Biological Structure and Function, page 7. Academic Press. O.H.Gaebler, éditeur.

33 - v. Hofsten, Bengt (1962) Acta Universitatis Upsaliensis, 12.

34 - Jacob, F., Perrin, D., Sanchez, C. et Monod, J. (1960) C. R. Acad. Sci., 250, 1727.

35 - Clark, A. J. et Margulies, A. D. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci., 53, 451.

36 - Jacob, F., Sussman, R. et Monod, J. (1962) C. R. Acad. Sci., 254, 4214.

37 - Wiesmeyer, H. (1966) J. Bact., 91, 89.

38 - Burstein, C., Cohn, M., Kepes, A. et Monod, J. (1965), Biochim. Biophys. Acta, 95, 634.

39 - Cohn, M. et Monod, J. (1953) dans Adaptation in Micro-organisms, page 138, Cambridge Univ. Press, London, R. Davies et E. F. Gale, éditeurs.

40 - Müller-Hill, B., Rickenberg, H. V., Wallenfels, K. (1964) J. Mol. Biol., 10, 303.

41 - Loomis, W. F. et Magasanik, B. (1964) J. Mol. Biol., 8, 417.

42 - Burstein, C., Cohn, M., Kepes, A. et Monod, J. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 95, 634.

43 - Monod, J. (1942) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, (Hermann, ed.), Paris.

44 - Gale, E. F. (1953) Bact. Rev., 7, 139.

45 - Mandelstam, J. (1961) Biochem. J., 79, 489.

46 - Loomis, W. F. et Magasanik, B. (1965) Biochim. Biophys. Res. Comm., 20, 230.

47 - Newton, W. A., Beckwith, J. R., Zipser, D., Brenner, S. (1965) J. Mol. Biol., 14, 290.

48 - Brenner, S. et Beckwith, J. (1965) J. Mol. Biol., 13, 629.

49 - Sarabhai, A. S., Stretton, A. O. W., Brenner, S. et Bolle, A. (1964) Nature, 201, 13.

50 - Hanawalt, P. et Wax, R. (1964) Science, 145, 1061

51 - Benzer, S. et Champe, S. P. (1961) Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 1025.

52 - Epstein, R. H., Bolle, A., Steinberg, C. M., Kellenberger, E., Boy de la Tour, Chevalley, R., Edgar, R. S., Susman, M., Denhardt, G.H., Leilausis, A. (1963) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 375.

53 - Campbell, A. (1961) Virology, 14, 22.

54 - Zinder, N. D. et Cooper, S. (1964) Virology, 23, 152.

55 - Garen, A. et Siddiqi, O. (1962) Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1121.

56 - Brenner, S. et Stretton, A. O. W. (1965) J. Mol. Biol., 13, 944.

57 - Brenner, S., Stretton, A. O. W. et Kaplan, S. (1965) Nature, 206, 994.

58 - Capecchi, M. R. et Gussin, G. N. (1965) Science, 149, 417.

59 - Engelhardt, D. L., Webster, R. E., Wilhelm, R. C. et Zinder, N. D. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci., 54, 1791.

60 - Bollen, A., Herzog, A. et Thomas, R. T. (1965) Arch. Intl. Physiol. Biochim., 73, 557.

61 - Weigert, M. G. et Garen, A. (1965) J. Mol. Biol., 12, 445

62 - Weigert, M. G., Lanka, E. et Garen, A. (1965) J. Mol. Biol., 14, 522.

63 - Gallucci, E. et Garen, A. (1966) J. Mol. Biol., 15, 193.

64 - Brenner, S. et Beckwith, J. R. (1965) J. Mol. Biol., 13, 629.

65 - Garen, A., Garen, S. et Wilhelm, R. C. (1965) J. Mol. Biol., 14, 167.

66 - Ames, Bruce N. et Whitfield, Jr., H.J. (1966) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., XXXI, sous presse.

67 - Gerhardt, J. C. et Schachman, H. K. (1965) Biochemistry, 4, 1054.

68 - Appella, E. et Tomkins, G. M. (1966), J. Mol. Biol., 18, 77.

69 - Taketa, K. et Pogell, B. M. (1965) J. Biol. Chem., 240, 651.

70 - O'Donovan, G. A. et Ingraham, J. I. (1965), Proc. Nat. Acad. Sci., 54, 451.

71 - Changeux, J. P. (1965) Bull. Soc. Chim. Biol., XLVII, 115.

72 - Garen, A. et Garen, S. (1963) J. Mol. Biol., 6, 433.

73 - Garen, A. et Echols, H. (1962) Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1398.

74 - Garen, A. et Otsuje, N. (1964) J. Mol. Biol., 8, 841.

75 - Jacob, F., Sussman, R. et Monod, J. (1962) C. R. Acad. Sci., 254, 4214.

LISTE DES ABBREVIATIONS

Gènes et leur produit

Z	β-galactosidase
Y	β-galactoside perméase
A	β thio galactoside transacétylase
z	gène gouvernant la synthèse de Z
y	" " " " Y
a	" " " " A
Lac	région du chromosome portant les gènes: i, o, z, y, et a
su	gène suppresseur
rec	gène gouvernant la capacité de recombinaisons
i	gène régulateur de l'opéron "Lac"
R	produit du gène i
o	gène opérateur de l'opéron "Lac"
Δ_{Lac}	délétion touchant la région "Lac"

Milieux de culture

EMB	milieu indicateur contenant éosine et bleu de méthylène
Mac	" " MacConkey
TTZ	" " au tétrazolium

Sucres

TPG	phényl β-D-thiogalactopyranoside
IPTG	isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
nPTG	n-propyl β-D-thiogalactopyranoside
TMG	méthyl β-D-thiogalactopyranoside
GTG	1-O-β-thiogalactopyranosyl glycérol
BuTG	butyl β-D-thiogalactopyranoside
βMG	méthyl β-D-galactopyranoside
ONPG	ortho nitrophényl-β-D-galactopyranoside

BNG	6 bromo 2 α naphtyl β-D-galactopyranoside
TDG	galactose β-D-thiogalactoside
lac	lactose
gal	galactose
glu	glucose
méli	mélibiose

Divers

Tris	Tris (hydroxyméthyl) amino méthane
NG	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
FB	"Fast Blue" RR salt
TTZ	2-3-5 triphényl tétrazolium chloride
Sm	streptomycine
A	L arginine
T	L thréonine
L	L leucine
H	L histidine
Try	L thryptophane
M	L Méthionine
B_1	thiamine
Ad	adénine
ARNm	acide ribonucléique messager
ADN	acide désoxyribonucléique
UAG	trinucléotide à séquence de bases: uracile-adénine-guanine
UAA	" " " uracile-adénine-adénine